



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



ALINE FREITAS DE PAULA MELO

**ENSAIOS *IN VITRO* DE CÉLULAS UNK DE CAMUNDONGOS EM MEIO
SUPLEMENTADO COM HORMÔNIOS GONADOTRÓFICO CORIÔNICO E
ESTROGÊNICO**

**IN VITRO ASSAYS OF MICE UNK CELLS IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH
CHORIONIC GONADOTROPIN AND ESTROGENIC HORMONES**

CAMPINAS

2018

ALINE FREITAS DE PAULA MELO

**ENSAIOS *IN VITRO* DE CÉLULAS UNK DE CAMUNDONGOS EM MEIO
SUPLEMENTADO COM HORMÔNIOS GONADOTRÓFICO CORIÔNICO E
ESTROGÊNICO**

**IN VITRO ASSAYS OF MICE UNK CELLS IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH
CHORIONIC GONADOTROPIN AND ESTROGENIC HORMONES**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na
área de concentração em Biologia Celular.

Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for
the degree of MSc. in Cellular and
Structural Biology in the Cellular Biology
concentration area

ORIENTADOR: ÁUREO TATSUMI YAMADA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
ALINE FREITAS DE PAULA MELO E ORIENTADA PELO
PROF. DR. ÁUREO TATSUMI YAMADA.

Campinas

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 134618/2015-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M491e Melo, Aline Freitas de Paula Melo, 1988-
 Ensaio *in vitro* de células uNK de camundongos em meio suplementado
 com hormônios gonadotrófico coriônico e estrogênico / Aline Freitas de
 Paula Melo. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

 Orientador: Áureo Tatsumi Yamada.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
 Biologia.

 1. Células matadoras naturais. 2. Gonadotropinas coriônicas. 3.
 Progesterona. I. Yamada, Áureo Tatsumi, 1957-. II. Universidade Estadual de
 Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *In vitro* assays of mice uNK cells in medium supplemented with chorionic gonadotropin and estrogenic hormones **Palavras-chave em inglês:**

Killer cells, Natural

Chorionic gonadotropins

Progesterone

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Áureo Tatsumi Yamada [Orientador]

Sílvio Roberto Consonni

Márcia Cristina Bizinotto

Data de defesa: 27-04-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)

Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni

Profa. Dra. Márcia Cristina Bizinotto

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico essa dissertação aos meus amados pais, meus sinônimos de força e perseverança. Por me fazerem acreditar que a única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível.

*“Guimarães Rosa profetizou que os homens
haveriam de ficar loucos em decorrência da
lógica. Já está acontecendo em nossas
instituições de pesquisa. "Vivam os pianos!
Mas os concertos estão proibidos!"*

O que é científico? Rubem Alves, 2007

*“A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo.”*

(Nelson Mandela)

Agradecimentos

Agradeço....

... ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, UNICAMP, por possibilitar a realização do meu mestrado.

... a agência de fomento à pesquisa CNPq, cujo apoio financeiro permitiu a realização deste trabalho.

... aos laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Laboratório Nacional de Biociência (CNPEM), Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME-IB) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica aplicada à Biologia Celular (INFABIC) por me permitirem realizar todos os experimentos e imagens utilizadas neste estudo.

... ao meu admirado orientador, Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, pela orientação e dedicação durante esses anos, por auxiliar em meu crescimento profissional e pessoal dividindo comigo suas experiências e sua vasta sabedoria, meu maior exemplo de conduta profissional, honestidade e ser humano.

... aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, em especial ao professor Silvio Roberto Consonni por toda ajuda prestada.

... à professora Maria Sílvia Viccari Gatti, pelos ensinamentos e partilha de conhecimentos.

... a Deus por me dar discernimento nas escolhas durante minha ínfima trajetória nesses 29 anos e, aos meus queridos pais Maria Andréia e Marco Antônio pelo exemplo de amor e integridade que me auxiliaram a tornar-me a pessoa que sou hoje. Eu os amo, na plenitude de tudo o que isso possa representar.

... à toda minha família por todo o carinho e alegria, em especial as minhas queridas irmãs Verônica e Natália.

... à memória do meu avô Ordélio, por todos os conselhos, ajuda e esmero sempre com seus filhos e netos, meu maior exemplo de superação e sabedoria.

... as minhas queridas avós Shirley e Verônica (*in memoriam*), pelo carinho e dedicação a família sempre.

... aos amigos admiráveis que tive o prazer de conhecer no Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, em especial Bianca, Fernanda, Renata, Viviane, Marina Angela, Carol, Aline Mika, Thaísa, Denis e Diego que tanto me ajudaram e pela amizade que construímos dentro e fora do laboratório. Obrigada por tornarem os meus dias mais leves e alegres, foi um prazer trabalhar ao lado de vocês.

... aos técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual.

... à todos que de alguma forma participaram e contribuíram nessa jornada e que, apesar da distância, sempre estiveram na torcida.

RESUMO

O hormônio gonadotrofina coriônica (CG) é sintetizado e secretado pelos trofoblastos logo após a implantação intersticial do embrião no endométrio tanto de humanos quanto de roedores atuando na atividade das células luteínicas ovarianas, assim como no útero assegurando a gravidez bem sucedida. Ao lado do CG, os hormônios esteróides estradiol (E) e progesterona (P) são essenciais no estabelecimento e desenvolvimento da gestação, atuando sobre diferentes tipos celulares. Presume-se que nas células *Natural Killer* uterinas (uNK) estes hormônios regulam direta ou indiretamente o recrutamento, proliferação, diferenciação e diversas funções dessas células. No presente trabalho, inicialmente avaliamos e confirmamos a expressão do receptor do hormônio gonadotrofina coriônica (CGR) nas células uNK de camundongos por meio da imunocitoquímica. Em seguida foram avaliadas a viabilidade das células uNK isoladas do útero de camundongos no 9º dg e cultivadas em meios suplementadas com CG, P e E. Os sobrenadantes e células destas culturas foram coletadas e analisadas quantitativamente para as concentrações de VEGF (vascular endothelial factor), TNF- α , IFN- γ , IL-10, granzima B. Da mesma forma, os sobrenadantes e/ou células foram coletadas de células uNK em cultivo com meio suplementado com os hormônios foram desafiadas na presença de LPS (lipopolissacarídeo) ou, do líquido amniótico ou, em co-cultivo com células embrionárias (E14Tg2A), para análise quantitativa das concentrações de VEGF, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e Granzima B. Nossos resultados demonstraram que as células uNK de camundongos expressam o receptor LH/CGR e são responsivas ao hormônio CG isoladamente e em combinação com P e E, *in vitro*. Sob a influência de CG e P, as células uNK perduram por mais tempo promovendo sua diferenciação *in vitro*, porém são reguladas negativamente quanto à biossíntese e secreção de mediadores citotóxicos/citolíticos como o TNF- α e a granzima B, assim como, do fator angiogênico VEGF. Por outro lado, as células uNK em meio suplementado pelo CG+E+P e desafiadas com LPS, líquido amniótico e células E14Tg2A aumentam a produção da proteína lítica granzima B, relacionada com a via citotóxica da resposta imune inata, sem contudo afetar a expressão de TNF- α e VEGF.

ABSTRACT

Chorionic gonadotrophin hormone (CG) is synthesized and secreted by trophoblast after embryo implantation into the endometrium both in human and rodents and regulate the activities of ovarian luteal cells, as well as, modulate the uterine activities to support the healthy pregnancy. The CG and steroid hormones estradiol (E) and progesterone (P) are all together active players affecting several cell types in the maternal-fetal interface of pregnant uterus and therefore considered essential for successful pregnancy. It is presumed these hormones regulate directly or indirectly the recruitment, proliferation, differentiation and many functions of uterine natural killer (uNK) cells. Afterward were evaluated the viability of uNK cells isolated from mouse pregnant uterus at 9th gestational day and cultured in medium supplemented with CG, E and P. Supernatant and cells of these uNK cells culture with hormones were collected after 24h and performed the quantitative analysis of VEGF (vascular endothelial factor), TNF- α , IFN- γ , IL-10 and Granzyme B. In the same way, uNK cells in culture were challenged with LPS (lipopolysaccharides), amniotic fluid or co-cultured with mouse embryonic cell (E14Tg2A) and these supernatant and/or cells collected for quantitative analysis of VEGF TNF- α , IFN- γ , IL-10 and Granzyme B. Our results show that mouse uNK cells express CG receptor (LH/CGR) and are sensitive to CG or its combination with P and E. The uNK cells under CG and P stimuli endure for longer time and differentiate in culture, yet their synthesis and secretion of cytolytic/cytotoxic mediator TNF- α and granzyme B, as well as VEGF expression are downregulated. On the other hand, uNK cells in medium supplemented with CG + E + P and challenged with LPS, amniotic fluid and E14Tg2A cells increase the production of granzyme B lytic protein, related to the cytotoxic pathway of the innate immune response, without however affecting expression of TNF- α and VEGF.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Os hormônios gonadotróficos coriônico e estrogênicos ovarianos no útero gestante	13
1.2 Células uNK, um subtipo funcional específico da gestação	16
1.3 Potencial citotóxico das células uNK na resposta imune inata	19
1.4 Evidências da capacidade de resposta imune inata das células uNK	22
1.5 Experimentos <i>in vitro</i> das células uNK	23
2. OBJETIVOS	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 Animais	27
3.2 Reação imunocitoquímica anti-CGR	27
3.3 Isolamento de células uNK	28
3.3.1 Isolamento e purificação de células uNK DBA ⁺	29
3.3.2 Isolamento e purificação de células uNK em gradiente de Percoll	29
3.3.3 Purificação das células uNKDBA ⁺ em gradiente de Percoll	30
3.4 Imunofenotipagem das células isoladas em gradiente de Percoll	30
3.5 Cultivo de células uNK em <i>microspot</i>	30
3.5.1 Cultivo <i>microspot</i> de células uNKDBA ⁺ em câmaras de cultivo acopladas a lâminas histológicas	31
3.5.2 Cultivo <i>microspot</i> de células uNK em lâminas com máscara de epoxy	32
3.6 Testes para retenção e preservação das células uNK em cultivo para análise morfológica pela reação citoquímica de lectina DBA (<i>Dolichos biflorus</i>)	33
3.7 Microscopia Eletrônica de células uNK cultivadas em meio suplementado com CG	33
3.8 Cultivo de células uNK em meio suplementado com hormônios gonadotrofina coriônica, progesterona e estradiol	34
3.9 Ensaio funcionais das células uNK desafiadas na atividade citolítica/citotóxica	35
3.9.1 Desafio com LPS	35
3.9.2 Desafio com líquido amniótico	36
3.9.3 Co-cultivo com células embrionárias CTE E14Tg2A	36
3.10 Quantificação de proteína total	37

3.11 Imunoensaio Multiplex	37
3.12 Análises estatísticas	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Expressão do receptor de hormônio gonadotrofina coriônica (CG) no útero gestante de camundongos	39
4.2 Isolamento e purificação de células uNK	39
4.3 Testes de cultivo primário de células uNK em <i>microspots</i>	41
4.4 Testes para retenção e preservação das células uNK em cultivo	42
4.5 Efeito dos hormônios gonadotrofina coriônica, progesterona e estradiol na sobrevida das células uNK in vitro	42
4.6 Expressões de TNF- α , Granzima B, VEGF, IL-10 e IFN- γ das células uNK sob efeito dos hormônios gonadotrofina coriônica, progesterona e estradiol in vitro	45
4.7 Ensaio funcionais das células uNK em meio condicionado suplementado com hormônio gonadotrófico coriônico	48
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	62
7. ILUSTRAÇÕES	63
8. REFERÊNCIAS	77
9. ANEXOS	102

1.INTRODUÇÃO

Na gestação de animais com placentação hemocorial como em humanos e camundongos, diversos tecidos uterinos sofrem transformações imprescindíveis tais como a decidualização, remodelação vascular e acúmulo transitório de linfócitos *natural killer* específico do útero gestante (uNK) que modulam os processos de implantação embrionária, organogênese da placenta e acomodação do feto em crescimento. As transformações mais marcantes relacionam-se com remodelação do endométrio (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993; LEONARD et al., 2006; GELLERSEN; BROSENS; BROSENS, 2007; ZHANG et al., 2008, 2011; HERINGTON et al., 2009; RAMATHAL et al., 2010).

Tais transformações do útero são reguladas primariamente pelos hormônios estrogênicos ovarianos estradiol (E) e progesterona (P), os quais atuam nos diferentes tipos celulares do útero de acordo com as expressões dos respectivos receptores (ER, PR) ainda no útero não-gestante, sem os quais, não inicia a gestação. No útero gestante, as células trofoblásticas sintetizam e secretam o hormônio gonadotrofina coriônica (CG) que se caracteriza como o hormônio da gravidez (ou da gestação) e tem como função a ação semelhante ao do hormônio luteinizante (LH) hipofisário na manutenção da biossíntese e secreção da progesterona pelas células do corpo lúteo. Ou seja, o estabelecimento da gravidez e o seu sucesso envolve a participação sincronizada dos hormônios estrogênicos ovarianos e do hormônio gonadotrófico coriônico placentário. Cada um destes hormônios atua sobre o conjunto diversificados de células maternas do ambiente uterino que remodelam ativa e continuamente a interface materno-fetal ao longo da gestação (SCHUMACHER; COSTA; ZENCLUSSEN, 2014; GAILLY-FABRE; KERLAN; CHRISTIN-MAITRE, 2015).

1.1 Os hormônios gonadotrófico coriônico e estrogênicos ovarianos no útero gestante

O hormônio gonadotrofina coriônica (CG) sintetizado e secretado pelos trofoblastos é um hormônio glicoproteico, heterodimérica constituída pela subunidade α de 14,9 kDA, idêntica às dos hormônios hipofisários luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) e tireoestimulante (TSH) (BELLISARIO; CARLSEN; BAHL, 1973). A cadeia da subunidade β de 24kDA do CG embora apresente homologia com LH e TSH é distinta pela composição da

cadeia de carboidratos (BAHL et al., 1972; BELLISARIO; CARLSEN; BAH, 1973). Este hormônio é sintetizado e secretado pelos trofoblastos logo após a implantação intersticial do embrião no endométrio tanto de humanos quanto de roedores (camundongos e ratos), assim como, de outros animais tais como de bovinos e suínos. São identificadas até 30 isoformas diferentes do CG durante a gestação em humanos, algumas das quais são produzidas também pela adenohipófise, cujas especificidades na atividade funcional são determinadas pelos receptores expressos nas células alvo que reconhecem ou não a subunidade β do CG (MOSTAJERAN et al., 2017). Porém, os receptores β reconhecem também o LH hipofisário e por esta razão, estes receptores são denominados LH/CGR (TSAMPALAS et al., 2010; KABLY AMBE et al., 2012). A literatura não discrimina os usos das siglas CG (*chorionic gonadotropin hormone*) e hCG (*human chorionic gonadotropin*), sendo ambas utilizadas como sinônimos. No presente estudo será doravante adotada simplesmente a sigla CG.

Tanto em humanos quanto em roedores (camundongos e ratos) os alvos primários do LH sintetizado e secretado pela adenohipófise são os órgãos gonadais (ovários e testículos). No ovário, as células do estroma e das tecas dos folículos ovarianos expressam receptores LH/CGR. As células alvos do folículo ovariano promovem inicialmente a biossíntese e secreção do estradiol e, na segunda metade do ciclo ovariano as células do corpo lúteo dependem do estímulo do LH para a biossíntese e secreção de progesterona. No testículo, as células intersticiais ou de Leydig expressam LH/CGR e produzem testosterona sob o estímulo de LH (MURAYAMA et al., 2012).

O CG produzido pelos trofoblastos placentários em implantação consolidada, tem ação inibitória sobre a hipófise na produção do LH, porém atua diretamente no ovário, mimetizando a atividade do LH sobre as células do corpo lúteo estimulando, os mesmos receptores LH/CGR, na biossíntese e secreção de progesterona durante o primeiro trimestre da gestação (HANSEL; BLAIR, 1996). O CG é produzido precocemente pelos blastocistos pós-eclosão (destituído da zona pelúcida), supostamente promovendo a ativação da janela de implantação em mecanismos ainda desconhecido (MANSOUR et al., 2011; XIAO-YAN et al., 2013; SANTIBAÑEZ et al., 2014). Ou seja, a expressão de receptores LH/CGR não é exclusiva das células gonadais feminina e masculina, sendo também comprovadas em diversos outros órgãos extra-gonadais em diversos animais, inclusive humanos (ZIECIK et al., 2007). Tais diversidades de expressão faz presumir uma ampla variedade de funções e respostas mediadas tanto pelo LH quanto pelo CG, além daquelas clássicas já conhecidas nas gonadas feminina e masculina.

No útero humano, as expressões dos receptores de LH/CGR são relatadas nas células do estroma endometrial, sendo particularmente intensa na camada muscular média e endotélio dos vasos arteriais do endométrio e, no miométrio tanto na fase proliferativa, quanto na secretora da ciclo menstrual e também na menopausa (LEI; RAO, 1992). A expressão nas células musculares lisas dos vasos arteriais sugerem que os hormônios gonadotrófico hipofisário e placentário possam exercer função reguladora no fluxo sanguíneo do endométrio (LEI; RAO, 1992). A ação direta do CG nos diversos tecidos do útero gestante é ainda controversa, porém de acordo com Mostajeran e colaboradores (2017), a injeção dose dependente da CG intra-uterina em pacientes submetidas à fertilização in vitro promovem melhorias substâncias, incluindo pacientes com histórico de aborto recorrente. Schumacher e colaboradores (2013) demonstraram que o CG, contribui para a tolerância fetal não só atraindo maior número de células T reg à interface materno-fetal, mas também aumentando a capacidade imunossupressora dessas células.

Os hormônios estradiol e progesterona atuam na regulação do recrutamento, proliferação, diferenciação e função das células uNK via ação direta sobre os receptores nucleares intracelulares ou indireta através de células intermediárias no útero durante o início da gravidez (DOSIOU; GIUDICE, 2005; WALLACE; FRASER; CARTWRIGHT, 2012; GONG et al., 2017). Estudo realizado por Gibson e colaboradores (2015), demonstram que os estrógenos também são produzidos localmente no endométrio gestante e podem regular diretamente a atividade das células uNK de humanos. Os estudos de Guo e colaboradores (2012) demonstram que as uNK de humanos não expressam o receptor para progesterona (PR) mas apresentam o receptor de glicocorticoide (GR) que pertencem à mesma família de receptores.

O estradiol e progesterona podem ativar a expressão gênica de proteínas imunomoduladoras ou angiogênicas nas células uNK em camundongos como a expressão do imunossupressor galectina-1 (DOSIOU; GIUDICE, 2005). O estradiol aumenta a secreção de CCL2 em células uNK para regular positivamente a neovascularização no endométrio (GIBSON et al., 2015), enquanto a progesterona induz a expressão de IFN- γ que pode resultar na supressão da ativação de NF- κ B e STAT4 (GUO et al., 2012). As células do estroma endometrial, os trofoblastos e linfócitos T são propensos a transdutores de proteínas intermediárias de progesterona produzindo o Hoxa-10 (YAO et al., 2003), o fator de bloqueio induzido por progesterona (BOGDAN; BERTA; SZEKERES-BARTHO, 2017) e citocinas Th2 (MIYAURA; IWATA, 2002), respectivamente, que reduzem a citotoxicidade das células uNK. Desta forma, ambos os hormônios ovarianos estrógeno e progesterona podem ser considerados

críticos tanto para o acúmulo local das células uNK, quanto para modulação das suas funções no útero gestante.

1.2 Células uNK, um subtipo funcional específico da gestação

O acúmulo transitório de células natural killer (NK) no útero gestante é um fenômeno intrigante da biologia da reprodução, considerando serem estas células pertencentes à categoria de leucócitos efetores da resposta imune inata e constituem a população leucocitária predominante (>85%) no útero gestante. Isto é, as células NK encontradas no sangue circulante ou em outros órgãos periféricos não-hematopoiéticos (cNK) são células imuno-efetoras com ação citotóxica contra células alteradas por vírus ou células tumorais. Por outro lado, as células NK que acumulam no útero gestante (uNK) são consideradas células imunomoduladoras que toleram o trofoblasto do embrião semi-alogeneico responsável pela implantação embrionária intersticial e placentação hemocorial e que, perante os trofoblastos, produzem fatores angiogênicos que modulam a remodelação vascular do endométrio tanto em humanos (KING e LOKE, 1991; LIPPE e colab., 2013) como em camundongos (LIMA; PAFFARO; YAMADA, 2013; CROY et al., 2014) que suprem os nutrientes e oxigenação da placenta hemocorial.

Em humanos, as células uNK são identificadas como CD56^{bright} CD16^{dim}, produtoras de citocinas e fatores de crescimento que auxiliam na modulação da homeostasia da interface materno-fetal (MOFFETT-KING, 2002; LEONARD et al., 2006; HANNA; MANDELBOIM, 2007; BARRIENTOS et al., 2009; BLOIS; KLAPP; BARRIENTOS, 2011). As células uNK de humanos compreendem duas subpopulações, onde predominam as uNK CD56^{bright}CD16⁻ ou CD56^{bright}CD16^{dim} (90%) e 10% são uNK CD56^{bright}CD16⁺ que diferem funcionalmente. Assim como nas células NK encontradas no sangue circulante (cNK) que são predominantemente CD56^{dim}CD16⁺, as uNK CD16⁺ são citolíticas, enquanto as CD16⁻ são secretoras de citocinas e quimiocinas (SAITO et al., 1993; MOFFETT-KING, 2002; LAIRD et al., 2003; TUCKERMAN et al., 2010). Mesmo entre as populações de células uNK CD56^{bright}CD16⁻ e células NK CD56^{bright}CD16⁻ do sangue circulante (cNK) há diferenças no perfil de receptores, sendo as uNK KIR⁺, CD69⁺ e CD62⁻, enquanto as cNK são KIR⁻, CD69⁻ e CD62⁺ (DOSIOU; GIUDICE, 2005). É importante mencionar ainda que na distinção fenotípica, as células cNK CD56^{bright} são agranulares, enquanto as uNK CD56^{bright} na decídua são na sua grande maioria semelhantes aos linfócitos granulares (KING; LOKE, 1991) e de acordo com o perfil de expressão gênica entre as populações de cNK CD56^{dim}CD16⁺ e as uNK CD56^{bright}CD16⁻, estas

uNK apresentam genes relacionados à atividade citotóxica como a perforina, granulicina, TNF- α e IFN- γ (KOOPMAN et al., 2003) o que caracteriza diferenças morfológicas e variações funcionais entre as subpopulações de células de cNK e uNK.

Portanto, as células uNK CD56^{bright} são fenotipicamente distinguíveis das populações das células cNK CD56^{bright}, baseado na expressão de CD9, CD103, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D e receptores inibidores KIR (*killer inhibitory receptor*) (HANNA; MANDELBOIM, 2007; HUNTINGTON; VOSSHENRICH; DI SANTO, 2007). Contudo, o conteúdo de grânulos repletos de mediadores citolíticos como perforina, granzima A e B ao lado de uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias que as células uNK sintetizam na interface materno-fetal (KOPCOW et al., 2005), sugerem uma atividade citolítica/citotóxica. Apesar de inúmeras evidências indiretas sobre atividade citotóxica das células uNK com consequente interrupção da gravidez, este fenômeno não está comprovado experimentalmente. Naturalmente, as restrições éticas para experimentações em humanos limitam os avanços nestes estudos, tornando o uso de animais experimentais imprescindíveis para elucidar os mecanismos que afetam a relação causa e efeito do envolvimento das células uNK na saúde da gestação normal e suas complicações.

Em camundongos, as células cNK do sangue ou as uNK do útero gestante não expressam as moléculas CD56 e não se conhece o seu homólogo. As células NK de camundongos são reconhecidas pela expressão da molécula de superfície CD122 (IL-2R β /15R) (ROSMARAKI et al., 2001; TANG; ALFIREVIC; QUENBY, 2011), e que para distinguir dos linfócitos T que também expressam o CD122, o fenótipo das células NK em geral é considerado CD3⁻CD122⁺ (COLUCCI; CALIGIURI; DI SANTO, 2003). Morfologicamente, as células uNK de camundongo foram identificadas inicialmente como células granulosas da glândula metrial (GMGc) pela reatividade de seus grânulos citoplasmático à citoquímica de PAS e pela microscopia eletrônica (STEWART; PEEL, 1977). Paffaro e colaboradores (2003), introduziram a citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus*) para identificação seletiva das células uNK de camundongos que distinguem 4 subtipos morfológicos de acordo com o padrão de marcação na superfície celular e conteúdo e grânulos (PAFFARO et al., 2003; BIANCO et al., 2008; ZHANG et al., 2008; LIMA; PAFFARO; YAMADA, 2013). Este padrão de reatividade não é observada em outros leucócitos ou cNK de outros órgãos linfoides sugerindo que as uNK tenham fenótipos funcionais distintos de células cNK (PAFFARO et al., 2003; BIANCO et al., 2008; BIZINOTTO et al., 2008).

As células uNK DBA⁺ são encontradas no útero de camundongos após a implantação embrionária e aumenta gradualmente do 6º ao 12º dg pela rápida migração e proliferação exclusivamente na região mesometrial do útero gestante (PAFFARO et al., 2003). As células uNK DBA⁺ apresentam estágios de maturação compreendendo as células pequenas agranulares semelhantes a outros linfócitos indiferenciados; as com poucos grânulos no citoplasma; as maiores com numerosos grânulos citoplasmáticos e as senescentes com grânulos pequenos em citoplasma claro e núcleo com cromatina condensada (PAFFARO et al., 2003; LIMA; PAFFARO; YAMADA, 2013). A incidência destes subtipos na região mesometrial varia de acordo com período gestacional, sendo que do 9º ao 12º dg quando há maior incidência de células uNK DBA⁺, os subtipos menores com poucos grânulos ocupam predominantemente a área do MyLAP (*myometrium lymphoid aggregate of pregnancy*) e do MLAP (*mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy*) enquanto os subtipos maiores com grande quantidade de grânulos ocupam o ELAP (*endometrial lymphoid aggregate of pregnancy*) que compreende o endométrio não decidualizado do MLAP (LIMA; PAFFARO; YAMADA, 2013).

De acordo com este critério de identificação morfológico sugeriu-se que as células uNK DBA⁺ diferenciadas seriam aquelas que apresentam grânulos citoplasmáticos com conteúdo citolítico, e portanto uma célula efetora capacitada para resposta imune inata, enquanto as células uNK DBA⁺ pequenas e agranulares seriam funcionalmente inaptas ou imaturas na função lítica (PAFFARO et al., 2003; ZHANG et al., 2011). Lima e colaboradores (2012) identificaram que o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) é expresso tanto nas células uNK DBA⁺ agranulares e granulares, enquanto a proteína lítica perforina é expressa nas formas granulares. Portanto, as células uNK DBA⁺ são funcionalmente aptas na atividade angiogênica desde a sua forma agranular e mantêm esta atividade nas formas granulares, enquanto a competência funcional das células uNK na resposta imune inata como célula citolítica efetora estaria restrita às células DBA⁺ com grânulos. Contudo, se esta última origina da diferenciação das células uNK DBA⁺/VEGF⁺/agranulares permanece especulativa. Da mesma forma, não há evidências experimentais que expliquem o conteúdo citolítico das células uNK DBA⁺/perforina⁺/granulares ou mesmo, se estas células são competentes na atividade citotóxica da resposta imune inata.

Apesar destas atividades críticas na remodelação vascular do endométrio gestante, as células uNK não são imprescindíveis no sucesso da gestação, uma vez que a gravidez a termo é atingida em experimentos utilizando camundongos imunodeficientes ou depletados de células NK (ASHKAR et al., 2003). Por outro lado, nenhum dos relatos na literatura explicam ou

relevam o fato das células uNK de camundongos apresentarem o fenótipo de uma células citolítica, isto é, estão repletas de grânulos que contêm os mediadores citolíticos convencionais da resposta imune inata mediada pelas células NK, como a perforina e as granzimas (LIMA et al., 2012; ZAVAN; DO AMARANTE-PAFFARO; PAFFARO, 2015). Em humanos, diversos relatos clínicos apontam o aumento de células NK no sangue circulante e/ou no endométrio de pacientes com aborto recorrente ou interrupções da gravidez de causa desconhecida.

Desta forma, permanece como incógnita a atuação das células uNK na atividade citotóxica ou citolítica e seus mecanismos de ativação no útero gestante que possa comprometer o sucesso da gestação.

O influxo, proliferação e diferenciação das células uNK no útero gestante depende de alguns fatores cruciais para a manutenção dessas células. As citocinas são moléculas imprescindíveis na reprodução estando envolvidas em várias etapas deste processo como, desenvolvimento folicular, na implantação do embrião e no crescimento e diferenciação do endométrio (HUNT; ROBY, 1994; SAVINO; DARDENNE, 1995; SIMON; PELLICER; POLAN, 1995; PETRAGLIA et al., 1996). IL-15 é produzida por uma grande variedade de tipos celulares (NIEBALA; WEI; LIEW, 2002). Carson e colaboradores (1994), observaram que células NK expressam constitutivamente receptores de IL-15 e que a estimulação das NK circulantes de humanos leva à produção de citocinas. A expressão do receptor de IL-15 também foi identificada em células uNK (VERMA et al., 2000) e a IL-15 é encontrada no endométrio tanto de humanos (KING, 2000) como de camundongos (YE; et al., 1996), sua supressão (camundongos IL-15KO) não apresentam células uNK (ASHKAR et al., 2003). A produção de IL-15 pelas células decíduais no útero é regida por controle hormonal (OKADA et al., 2000) e estudos realizados em nosso laboratório com células uNK de camundongos, demonstraram que essa citocina é crucial para a manutenção dessas células *in vitro* (FARIAS, 2007).

Dessa forma além das citocinas consagradas como a IL-15 que é essencial para proliferação e diferenciação das células uNK no útero gestante, os hormônios ovarianos tanto o estrógeno quanto a progesterona, junto como CG placentário podem ser fatores críticos para a regulação das células uNK no útero gestante. Dados estes não considerados anteriormente nos ensaios que tiveram como alvo avaliar as respostas ou viabilidade das células uNK *in vitro*.

1.3 Potencial citotóxico das células uNK na resposta imune inata

As células Natural *Killer* circulantes (cNK) são efetoras da resposta imune inata com atividade citolítica/citotóxica e desempenham um papel importante no controle de infecções virais e eliminação das células tumorais (BIRON et al., 1999; IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002; BALKWILL, 2009). A atividade citotóxica se dá através da secreção de citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ e TNF- α (SANTOLI et al., 1978; WELSH, 1978; GRUNDY et al., 1982) que são estimuladas pela ativação de diversos receptores tais como o NKG2D (MORETTA et al., 2002; LANIER, 2005; LONG, 2008). Segundo os estudos realizados por Wang e colaboradores (2012), o IFN- γ e TNF- α são uma parte integrante da máquina efetora de cNK, e elas sinergicamente melhoraram a função citolítica das células cNK.

IFN- γ ativa o caminho de sinalização de STAT em células alvo, que conduz o controle da infecção (MIYAGI et al., 2007). O paradigma principal considera que a função anti-viral e anti-tumoral mediada pela citocina de células cNK é distinta da sua função lítica, uma vez que, células tratadas com IFN- γ tornaram-se resistentes à lise por cNK (FRIES;; GOLUB, 1988; GRÖNBERG et al., 1988; MAZIARZ et al., 1990; MAIO et al., 1991; RAMIREZ et al., 1992; NISHIMURA et al., 1994). Neste sentido, as células NK podem ser considerados simplesmente como um importante produtor de IFN- γ em resposta à estimulação de outras citocinas inatas ou reconhecimento de células alvo. Recentemente, demonstrou-se que as células cNK CD56^{dim} CD16⁺ liberam abundante quantidade de IFN- γ numa fase precoce da sua ativação (FAURIAT et al., 2010; JUELKE et al., 2010; DE MARIA et al., 2011), obscurecendo a divisão entre a produção de IFN- γ e função citotóxica das células NK. Estes dados redundantes sugerem que o efeito do IFN- γ pode variar de acordo com a concentração e combinações de fatores locais.

Os efeitos biológicos do TNF- α dependem da interação com o receptor, que pode ser TNFR1 (ou p55 ou CD120a) ou TNFR2 (ou p75 ou CD120b) (MCFARLANE et al., 2002; DAVISON et al., 2006). O receptor TNFR1, expresso constitutivamente, é encontrado em todas as populações celulares, liga-se preferencialmente ao TNF- α solúvel e está relacionado à maior parte das funções do TNF- α , incluindo morte celular e proliferação, principalmente quando interage com fatores intracelulares que ativam NF κ B e outros agentes (VANDENABEELE et al., 1995; SANCHEZ-MAZAS et al., 2000; HIRSCH; FILIPOVICH; MAHENDROO, 2006). Já o TNFR2, caracterizado como receptor induzível é encontrado apenas em células pertencentes ao sistema imune e células endoteliais, liga-se principalmente às moléculas de

TNF- α associadas à membrana e medeiam mecanismos de proteção celular não possuindo o domínio para iniciar a cascata apoptótica de morte celular (VISSER et al., 2002).

Assim como nas cNK, as células uNK de humanos e camundongos produzem inúmeras citocinas que atuam como mediadores da resposta imune, com ações peculiares na gestação (SCHÄFER-SOMI, 2003). As citocinas produzidas pela uNK e que atuam na gestação são: IL-1, fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulador de colônia (CSF-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IFN- γ (ASHKAR; DI SANTO; CROY, 2000; VAN DER MEER et al., 2004; WU et al., 2006).

De acordo com Ashkar e colaboradores (2000), as células uNK de camundongos sintetizam constitutivamente o IFN- γ durante a gestação e atuam na supra-regulação das vias de síntese de fatores angiogênicos na interface materno-fetal, porém não há relatos sobre a ação deletérias desta citocina na gestação. O TNF- α desencadeia inúmeros efeitos sobre diferentes populações celulares incluindo apoptose, inflamação e resposta a estresse no ambiente uterino (ASHKAR; DI SANTO; CROY, 2000; LADEMANN; KALLUNKI; JÄÄTTELÄ, 2001), como, por exemplo, em casos de pre-eclâmpsia onde os níveis destas citocinas são elevados (SERIN et al., 2002; HIRSCH; FILIPOVICH; MAHENDROO, 2006).

A capacidade citolítica das células NK depende das proteínas líticas perforina (Prf) e granzimas (Gzm) contidas nos seus grânulos peculiares denominados lisossomo-secretores (STINCHCOMBE; GRIFFITHS, 1999). Estes grânulos estão também presentes nas células uNK de camundongos com igual componente de proteínas líticas perforina e granzimas (PAFFARO et al., 2003; LIMA et al., 2012). Morfologicamente, os grânulos lisossomo-secretores das células uNK, assim como das cNK e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL), exibem uma porção central eletrondenso considerado o domínio secretor com conteúdo de proteínas líticas como a Prf, Gzm e granulicina e, as áreas corticais de capuz eletrondenso contendo microvesículas membranosas de domínio lisossomal contendo enzimas hidrolíticas além de proteínas lisossomais transmembrana como: CD63, Lamp1 e Lamp2 (STEWART; PEEL, 1977; BULMER; JOHNSON, 1985; BURKHARDT; et al., 1990; PARR; et al., 1991; GRIFFITHS, 1997; METKAR et al., 2002; CLARK; GRIFFITHS, 2003; PAFFARO et al., 2003).

A Prf é o principal mediador citolítico das células NK e células T citotóxicas (LIU; WALSH; YOUNG, 1995) que sob estímulo é liberado na forma de monômeros que se inserem na membrana plasmática das células alvo, onde polimerizam e formam agregados de poros.

Quanto ao seu mecanismo de ação, tanto na sua forma monomérica quanto em complexo macromolecular com o serglicin (srgn), a Prf pode penetrar na membrana da célula alvo formando poros levam à lise osmótica (STEPP et al., 2000), ou ,promovendo o influxo de granzimas no interior de vesículas endossômicas das células alvo de modo similar a penetração celular mediada por vírus (METKAR et al., 2002).

As granzimas A (gzmA) e B (gzmB) são enzimas serina-esterases também acumulada constitutivamente no compartimento secretor dos grânulos lisossomo-secretor dos linfócitos T citotóxicos e NK (PARDO et al., 2002). Ambas são secretadas na forma de complexo macromolecular ligada ao pequeno proteoglicano srgn, e este só induz apoptose na célula alvo, quando forma um complexo maior com a Prf (LOPEZ et al., 2013). De acordo com esse modelo, (VEUGELERS et al., 2004) afirmam que na apoptose induzida pelas proteínas citolíticas grânulos, a endocitose da gzmB é um processo mediado por dinamina. Embora semelhantes quanto ao mecanismo de fragmentação do DNA da morte por apoptose, a ação letal da gzmA é mais lenta na indução *flip-flop* dos fosfolipídios da membrana plasmática, formação das vesículas (apoptosomos) na superfície celular, prolongando o período da morte celular (SUSANTO et al., 2013). Tanto a gzmA quanto a gzmB são encontrados nos grânulos dos linfócitos CT e NK atuando na via da fragmentação do DNA da morte celular por apoptose, porém cada uma destas granzimas são aparentemente seletivas para determinadas células alvos (PARDO et al., 2002).

1.4 Evidências da capacidade de resposta imune inata das células uNK

A capacidade de resposta imune do tipo inata contra possíveis agressões de patógenos tem sido evidenciada nas células cNK e uNK pela expressão de receptores de membrana para múltiplos ligantes como NKp30, NKp44, NKp46, entre outros (KOCH et al., 2013). Componentes bacterianos como o LPS (lipopolissacarídeo da parede bacteriana) e virais como o poly I:C (um mimetizante do RNA viral de cadeia dupla-dsRNA) podem desempenhar um papel importante na ativação da respostas imune inata e adaptativa pelo desencadeamento de receptores de reconhecimento padrão das células NK (ISHII et al., 2008).

O estudo realizado por Gendron e colaboradores (1990), demonstrou que o LPS (lipopolissacarídeo) administrado em camundongos no 7º dg produz 100% de reabsorção dos

embriões do cruzamento de camundongos CFW / SW×DBA, sem efeitos sistêmicos na mãe, as células da interface materno-fetal são altamente sensíveis a este componente da parede de bactérias gram-negativas. Ogando e colaboradores (2003), também demonstraram que a administração de LPS produz morte e necrose do embrião e da decídua próximo a este dentro de 24 horas. As interrupções da gravidez provocada pelo LPS parecem envolver a resposta das células uNK que produzem altos teores de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α que induz a morte das células trofoblásticas placentárias (MURPHY et al., 2009). De acordo com esses estudos, a resposta imune inata das uNK podem ser ativadas sob o estímulo do LPS. Além disso, a inoculação de poli (I:C) em camundongos gestantes provoca resposta das células uNK via receptor NKG2D, com aumento da produção de TNF- α e resultando na reabsorção embrionário ou parto prematuro dependendo da idade gestacional (THAXTON et al., 2013).

As células uNK reconhecem o embrião desde o momento da sua implantação, por meio de receptores de membrana KIR que reconhecem os antígenos MHC classe I não-clássicos (HLA C, HLA G) expressos pelos trofoblastos. Esta interação resulta na inibição da atividade citotóxica da resposta imune inata das células uNK tanto em humanos quanto em camundongos (MOFFETT; COLUCCI, 2014; COLUCCI; KIECKBUSCH, 2015). Portanto as células uNK na gestação normal aparentemente não atuam como efectoras da resposta imune inata. Porém, Lima e colaboradores (2012) relatam que a eutanásia intra-uterina do embrião promove a perda do conteúdo da proteína lítica perforina dos grânulos das uNK de camundongos em período inferior a 60 minutos, sugerindo a degranulação de mediadores citolíticos associada à resposta imune inata das células NK. Este relato é intrigante, onde os mecanismos de ativação da resposta imune inata das células uNK no ambiente uterino gestante pode ser rapidamente estimulada em lesão embrionária ou ruptura da membrana amniótica com o extravasamento do seu conteúdo no ambiente uterino.

1.5 Experimentos *in vitro* das células uNK

O uso de camundongos é amplamente adotado (CROY et al., 2014) nas investigações e ensaios experimentais para elucidação dos diversos mecanismos que atuam e regulam a biologia e patologias do útero gestante (CROY et al., 2014).

No tocante às células uNK, grandes avanços na compreensão da atividades destas células no útero gestante foram realizados utilizando camundongos geneticamente modificados, particularmente aqueles clones com deleções genéticas que resultam na supressão de linfócitos NK (ASHKAR et al., 2003; CROY et al., 2003). Avanços nas técnicas relacionados com a imunofenotipagem *in situ* (imunocitoquímica) e *in vitro* (citometria de fluxo) igualmente contribuíram na elucidação dos fenótipos funcionais das células uNK de humanos e camundongos (MALLIDI et al., 2009; ZAVAN et al., 2010). Porém, o avanço no conhecimento sobre a participação específicas das células uNK nas fisiopatologias da gestação exige ensaios funcionais com células isoladas *in vitro*, que ainda são escassos.

Ensaio funcionais alusivas às células uNK têm sido relatados com células NK *in vitro* isoladas do sangue circulante em humanos coletadas de mulheres gestantes (FUKUI et al., 2015; KOO et al., 2015; OTA et al., 2015). Contudo, é consenso de que as células uNK constituem um subtipo de linfócitos NK específico presente exclusivamente no útero gestante tanto de humanos, quanto de camundongos e portanto, apesar dos dados expressivos acumulados na literatura, presume-se não retratar a atividade funcional das células uNK na gestação. Compreensivelmente, o acesso ao útero gestante humano para fins experimentais é limitado tanto pela ética médica, quanto rigidamente controlada pelas leis locais na maioria dos países. Neste cenário, os animais de laboratório como os camundongos despontam como modelos experimentais de eleição.

O nosso laboratório estabeleceu os primeiros parâmetros dos procedimentos de isolamento positivo e meio condicionado para o cultivo de células uNKDBA⁺ de camundongos, no qual o revestimento do substrato com fibronectina e suplementação da citocina IL-15 são essenciais (CROY et al., 2010). Diferente de outros métodos de cultivo de leucócitos que presumem serem os leucócitos sempre flutuantes pelo fato de serem carregados em suspensão no sangue circulante, o estabelecimento do cultivo das células uNKDBA⁺ necessita do suporte de um componente específico da matriz extracelular, a fibronectina (CROY et al., 2010). O uso do gradiente de Percoll (30 e 40%) aprimorou os procedimentos de isolamento, aumentando significativamente a proporção de células uNK isoladas do útero gestante de camundongos incluindo nestas as células uNK tanto DBA⁺ quanto DBA⁻ (BIZINOTTO et al., 2014).

Baseado nos conhecimentos atuais acima relatados sobre a biologia da reprodução envolvendo as células uNK, o presente estudo procura comprovar inicialmente a expressão do receptor de CG (CGR) nas células uNK de camundongos e, avaliar as principais respostas funcionais (angiogênese e citotoxicidade) das células uNK *in vitro* frente aos meios

suplementados com os hormônios gonadotrófico coriônico (CG) e os estrogênicos ovarianos progesterona (P) e estradiol (E). Estes ensaios funcionais das células uNK in vitro incluem ainda os desafios frente à exposição ao LPS, líquido amniótico e co-cultura com células embrionárias de camundongos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos primários do presente estudo consiste em confirmar a expressão do receptor do hormônio gonadotrofina coriônica (CGR) nas células natural *killer* uterinas (uNK) de camundogos e avaliar o comportamento destas células *in vitro* em meios de cultivo suplementadas com hormônio gonadotrofina coriônica (CG) e desafiadas na ativação da resposta imune inata.

Os objetivos secundários do presente estudo consistem em:

1- Estabelecer os procedimentos padrões para o isolamento das células uNK de camundongos destinadas ao cultivo.

2- Otimizar os procedimentos de cultivo primário para manipulação das células uNK em meios suplementados com hormônios CG e estrogênicos, progesterona (P) e estradiol (E).

3- Avaliar a responsividade das células uNK em cultivo primário com meio suplementados pelos hormônios CG, P e E isoladamente e em combinações, quanto às ativações ou supressões da biossíntese e secreção do VEGF, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e granzima B.

4- Avaliar a responsividade das células uNK em cultivo primário com meio suplementado pelos hormônios CG, P e E desafiadas com pela adição do LPS, líquido amniótico e co-cultura com células embrionárias E14Tg2A de camundongos quanto, às ativações ou supressões da biossíntese e secreção do VEGF, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e granzima B.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas virgens e machos da linhagem C57BL6 provenientes do Centro Multidisciplinar de Controle para Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP), com idade de 4 semanas. Os animais foram mantidos no biotério do DBBT-IB/UNICAMP, com ciclo de exposição à luz de 12 horas, com acesso à água e ração comercial *ad libitum* até atingirem a idade de 8 a 10 semanas. Com esta idade, as fêmeas foram colocadas para acasalamento com machos e a manhã da constatação do tampão vaginal, foi considerado o 1º dia de gestação (dg). Todos os procedimentos de manutenção e manipulação dos animais foram realizados de acordo os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia, UNICAMP processo nº 4054-1.

3.2 Reação imunocitoquímica anti-CGR

Camundongos gestantes no 9ºdg foram sacrificados por deslocamento cervical e imediatamente laparatomizados para remoção dos ovários e cornos uterinos. Os sítios de desenvolvimento embrionário foram separados e juntamente com os ovários fixados em Metacarn durante 24 horas. Em seguida, foram imersos em gradiente crescente de sacarose 10%, 20% e 30% cada qual durante 12 horas e congelados em nitrogênio líquido embebidos no composto OCT (Tissue Tek, Sakura, EUA) e armazenadas a -80°C. Das amostras congeladas foram obtidos criocortes com 8µm no criostato (CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) ajustado a -25°C e coletadas em lâminas histológicas.

Os criocortes foram reconstituídos com solução do PBS (tampão fosfato-saline) 0,1M pH 7,4 à temperatura ambiente e em seguida incubados com solução *Blocking buffer* (BSA 1%, 0,1% de Triton-X 100, glicina 50mM em PBS 0,1M pH7,4) durante 30 minuto. Em seguida os criocortes foram lavados com solução *Working buffer* (*Blocking buffer*/PBS – 1:5) 3 vezes durante 3 minutos. Os criocortes foram incubados com o anticorpo anti-receptor de gonadotrofina coriônica humana feito em coelho (Abcam125214, diluída a 1:200) durante 12 hs a 4°C em câmara úmida. Após a remoção do Ac primário e lavadas, os criocortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-coelho conjugada com Alexa Fluor® 488 (Abcam-

AB150077) diluído a 1:200 durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, os criocortes foram lavados e incubados com lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*) biotinada (Sigma, St Louis, USA) diluída a 1:400 em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 durante 40 minutos à temperatura ambiente. Após lavados foram e incubados com estreptoavidina conjugada com *Texas Red* (Thermo Scientific) diluída a 1:400 em PBS 0,1M Ph 7,4 durante 30 minutos. Em seguida, os criocortes foram lavados em tampão PBS 0,1M e incubados com DAPI (sc-3598, Santa Cruz, CA, EUA) diluída a 1:1000 em tampão PBS 0,1M durante 5min. A montagem das lâminas foi realizada entre lamínulas com o meio *Vecta Shield Mounting Medium* (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). Como controle negativo da reação a etapa de incubação com o anticorpo primário e/ou com a lectina DBA foram omitidas. Os materiais foram analisados e documentados em microscópios de fluorescência confocal Upright LSM780-NLO (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular - INFABIC/UNICAMP) e confocal Leica SP8 (Laboratório Nacional de Biociência (LNBio).

3.3 Isolamento de células uNK

Para o isolamento das células uNK de camundongos foram adotados os procedimentos descritos por Croy e colaboradores (2010) e Bizinotto e colaboradores (2014). Em resumo, este procedimento consiste no uso de animais no 9ºdg sacrificados por deslocamento cervical e após assepsia em solução de etanol a 70%, os animais foram laparotomizados e os cornos uterinos foram removidos, imersos em meio *Hank's* (Sigma, St Louis, USA) e dissecados com instrumentos cirúrgicos esterilizados (autoclavadas) e em condições assépticas no fluxo laminar. As áreas do MLAP foram recortadas e dissociadas em 500µl de meio Hank's estéril contendo 1000UN/ml DNase (Sigma, St Louis, USA), por meio de repetidas aspirações com micropipeta. Esta suspensão celular foi filtrada em telas de nylon com malhas de 80µm, transferidas em tubos de microcentrifuga (2mL) e centrifugada a 250g durante 5 minutos a 4° C. O sedimento celular foi lavado por duas vezes em meio Hank's e as células viáveis quantificadas em câmara de Neubauer com a adição da solução de azul de trypan 0,4%.

Todas as soluções utilizadas para o isolamento e cultivo das células foram esterilizadas por meio de filtração em membrana de filtração (diâmetro do poro < 0,2µm) na câmara de fluxo laminar e acondicionadas em recipientes esterilizadas na autoclave.

3.3.1 Isolamento e purificação de células uNK DBA⁺

Na suspensão celular obtida em 3.3 foram adicionadas esferas magnéticas (Cellection 450, Invitrogen, USA) previamente revestidas com lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*) biotinada (Sigma, St Louis, USA) de acordo com as instruções do fabricante, na proporção de cinco esferas por célula uNK. A associação das esferas magnéticas foi realizada em microtubo sob agitação constante em rotor orbital durante 15 minutos a 4° C. Em seguida, o microtubo foi acoplado no concentrador de partículas magnéticas (MCP, Dynal Co, Denmark) para imobilização das células associadas às esferas em campo magnético e remoção das células livres em suspensão. As células associadas foram lavadas com solução *Hank's* contendo 0,1M de N-acetil, D-galactosamina (GalNAc – Sigma, St Louis, USA) e homogeneizada suavemente por 20 minutos a 4°C para remoção das esferas magnéticas da superfície celular. As esferas magnéticas removidas foram imobilizadas no MPC e a suspensão celular contendo uNKDBA⁺ foram quantificadas e acondicionadas em solução de *Hank's*. A suspensão de células livres recuperadas após a primeira associação com esferas magnéticas, foi submetida a uma segunda associação com as esferas magnéticas com os mesmos procedimentos descritos acima.

O conjunto de células da primeira e segunda associação foram agrupadas e lavadas em meio RPMI 1640 por centrifugação em 250g, por 5 minutos a 4°C e quantificadas em câmara de Neubauer e mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, St Louis, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e 150ng/mL da citocina IL-15 (Sigma, St Louis, USA).

3.3.2 Isolamento e purificação de células uNK em gradiente de Percoll

Foram preparados gradientes de Percoll (Cultilab, Brasil) nas concentrações de 70%, 40%, 30% e 20%, de acordo com a recomendação do fabricante em tubo de ensaio, cada qual com 500µL em ordem decrescente. Sobre o Percoll a 20% foram adicionadas a suspensão celular obtida em 3.3 e centrifugados a 750g por 30 minutos. Após a centrifugação, as células contidas em cada um dos gradientes foram coletados e quantificados em câmara de Neubauer, conforme descrito previamente por Bizinotto e colaboradores (2014).

As frações celulares dos gradientes de 40% e 30% foram coletados lavadas com RPMI 1640, quantificadas em câmara de Neubauer com a adição da solução de azul de trypan

0,4% e reconstituídas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e 150ng/mL da citocina IL-15 (Sigma, St Louis, USA)

3.3.3 Purificação das células uNKDBA⁺ em gradiente de Percoll

Células uNK DBA⁺ isoladas pelas esferas magnéticas conforme o método descrito no item 3.3.1 foram submetidas ao fracionamento e purificação nos gradientes de percoll em iguais condições descritas no item 3.3.2. As células coletadas das frações de 30 e 40% do gradiente de Percoll foram quantificadas em câmara de Newbauer.

3.4 Imunofenotipagem das células isoladas em gradiente de Percoll

As células obtidas nas frações de 30 e 40% do gradiente de Percoll foram submetidas às reações de imunomarcação com anticorpos anti-NK1.1 conjugado com PE (*mouse anti-mouse* BioLegend®), anti-CD3 conjugado com APC (*mouse anti-human* - BioLegend®) e pela lectina DBA (*Dolichos biflorus*) conjugado com FITC, (Vector FL-1031) para identificação das células NK do sangue periférico, linfócitos T e células uNK, respectivamente. As células marcadas foram analisadas no citômetro de fluxo - BD FACSCalibur™ e para as análises dos dados utilizou-se o BDCellQuest™ Pro software.

3.5 Cultivo de células uNK em *microspot*

Foram realizados diversos testes de procedimentos de cultivo das células isoladas nos diferentes protocolos descritos em 3.3. O grande fator limitante é o número de células isoladas viáveis de cada animal passíveis de serem mantidas em cultivo e destinadas aos experimentos subsequentes. Neste sentido, estipulou-se 3×10^4 células para cada cultivo em *microspot* no volume de 30μL como sendo o número mínimo de células tanto para as observações nos testes de viabilidade quanto para a análise dos ensaios funcionais subsequentes.

Nos cultivos de *microspot* todas as manipulações de trocas (aspiração e adição) dos meios de cultura foram realizadas por meio de capilares de vidros acoplados ao micromanipulador (Narishigue, Japão), sob observação ao microscópio estereoscópico (Olympys, Japão) ou microscópio invertido de contraste de fase (Nikon-TMS, Japan).

As finas pontas (diâmetro em torno de 0,1mm) de capilares de vidro (de micro hematócrito) de 1mm de diâmetro externo, foram preparados uma a uma manualmente por estiramento do vidro fundido ao fogo e posteriormente esterilizados em autoclave.

3.5.1 Cultivo *microspot* de células uNKDBA⁺ em câmaras de cultivo acopladas a lâminas histológicas.

As células obtidas em 3.3.1 (isoladas com esferas magnéticas) e 3.3.2 (isoladas em gradiente de Percoll) foram suspensas em meio RPMI 1640 condicionado estéril contendo 150ng/mL de IL-15, 10% Soro Fetal Bovino, 1% da solução de Penicilina/Estreptamicina (Gibco) e depositadas na proporção de 2×10^4 células no volume de 30µL nas câmaras das lâminas com 8 câmaras de cultivo (Nunc Inc, USA) previamente tratadas com fibronectina 2µg/ml (Sigma, St Louis, USA), conforme técnica preconizada por Croy e colaboradores (2010). As gotas de 30µL depositadas na área central de cada câmara foram cuidadosamente recobertas com óleo mineral estéril (Sigma, St Louis, USA) delimitando o *microspot* das células em cultura na estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Delicados movimentos circulares repetidos da lâmina provocam igualmente turbulência concêntricas das células no meio que tendem ao final sedimentar na área central do *microspot*. Foram realizadas cuidadosamente trocas (aspiração e adição) dos meios de cultura inserindo o capilar de vidro nas bordas da gota sem promover distúrbios nas células localizadas no centro do *microspot*. Estas trocas foram realizadas nos períodos de 6 e 24h. No período de 6h, foram removidas os restos celulares e células não aderidas. As análises das células em cultivo a fresco foram realizadas antes das trocas do meio nos intervalos de 6, 24 e 48h, observados ao microscópio invertido (Olympus, Japão). Para avaliar a morfologia e identificação das células uNK aderidas, parte dos cultivos foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% em PBS pH 7,4 e submetidas à reação citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*) em procedimento semelhante ao descrito no item 3.2 e observadas em microscopia de fluorescência (Eclipse 800, Nikon, Japão)

Cabe salientar que o recobrimento com óleo mineral dos cultivos em *microspot* constitui uma barreira física que evita contaminações pelos agentes exógenos como fungos e bactérias. Contudo, verificou-se a grande dificuldade em remover completamente este óleo do ambiente de cultivo, o que afeta os procedimentos nos ensaios subsequentes.

Por outro lado, a ausência do óleo mineral não permite confinar as gotas na forma de *microspot* exigindo maior volume de meio de cultura mesmo nas cavidades das microplacas (de 96 cavidades). O volume maior do meio de cultura juntamente com a área maior das cavidades das microplacas favorece o espalhamento das células em cultivo, exigindo maior número de células para o cultivo.

3.5.2 Cultivo *microspot* de células uNK em lâminas com máscara de epoxy

Em decorrência da dificuldade de remover o óleo mineral utilizada para recobrir os cultivos de *microspot* em câmaras de cultivo sobre lâminas de vidro, foi testado e adotado o uso de lâminas histológicas de reação com 10 anéis (8mm de \varnothing) delimitados com máscara de película epoxy (Lâmina de Imunofluorescência Lapidada, Perfecta). Os anéis delimitados destas lâminas esterilizadas foram tratados com fibronectina. 2 μ g/ml (Sigma, St Louis, USA) durante 12-24h em estufa com atmosfera de CO₂ a 5% em procedimentos semelhantes ao adotado para lâminas com câmara de cultura.

Foram depositadas gotas contendo 3x10⁴ células em 30 μ L de meio condicionado obtidos no processo de isolamento descrito em 3.3.1 e 3.3.2. Nestas condições, a gota permanece na forma de *microspot* circunscrito, na qual as células alvo sedimentam e permanecem aderidas após 6h de cultivo. As trocas dos meios de cultivo foram realizadas inicialmente após 6h para remoção dos restos celulares e células em suspensão. A partir de 6h pode ser utilizado volume maior do meio de cultivo para manutenção da cultura em *microspot*, quando as células permaneciam concentradas na área central. O espalhamento do volume maior (de até 50 μ L) do meio de cultivo era limitada pela borda da película da máscara epoxy. Foram realizadas trocas regulares dos meios de cultivo nos intervalos de 24hs e observadas no microscópio invertido (Olympus, Japão).

Para avaliar a morfologia e identificação das células uNK aderidas, parte dos cultivos foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% em PBS pH 7,4 e submetidas à

reação citoquímica de lectina DBA em procedimento semelhante ao descrito no item 3.2 e observadas em microscopia de fluorescência (Eclipse 800, Nikon, Japão).

3.6 Testes para retenção e preservação das células uNK em cultivo para análise morfológica pela reação citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus*)

Para análise morfológica das células uNK cultivadas em *microspot* com cobertura de óleo mineral ou em lâminas de reação com máscara epoxy sem a cobertura do óleo, procedeu-se a pré-fixação ou não das células com solução de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato 0,1M durante 15 minutos; - seguido da adição de 50% de soro sanguíneo de camundongo, ou, BSA 1% e 7% em PBS ou meio RPMI 1640, ou, gelatina a 0,1 e 3% durante 15 minutos destinado à proteção das células aderidas na superfície das lâminas. Após esse período, aquelas células que ainda não haviam sido fixadas, foram fixadas com PFA 4% por 15 minutos e lavadas em PBS 0,1M. Foi utilizada a lectina DBA biotinizada (2mg/mL, Sigma, St Louis, USA) diluída 1:400 em PBS 0,1M e incubada durante 4 a 6h em temperatura ambiente, seguida da incubação com estreptoavidina-conjugada com *Texas Red* (Thermo Scientific) diluída 1:200 durante 30 minutos. As observações foram realizadas em microscópio de fluorescência (Eclipse 800, Nikon, Japan).

3.7 Microscopia Eletrônica de células uNK cultivadas em meio suplementado com CG

Células uNK coletadas conforme o protocolo descrito em 3.3.2 foram cultivadas na proporção de 1×10^5 células em 100µl do meio condicionado suplementado com CG em placas de Petri com lamínula de fundo previamente tratadas com fibronectina durante 24hs. O sobrenadante foi removido e as células aderidas foram fixadas pela solução de glutaraldeído 2,5% (*Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA*) em tampão cacodilato de sódio 0,1M e cloreto de cálcio 3mM pH7,2 durante de 1 hora em banho de gelo. As células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e cloreto de cálcio 3mM 5 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (*Electron Microscope Science*) em tampão cacodilato 0,1M, cloreto de cálcio 3mM e 0,8% de ferrocianeto de potássio por 1 hora em banho de gelo. Em seguida as células foram lavadas em água mili-Q e pré-contrastadas com acetato de uranila 2% aquoso durante 12hs à

temperatura de 0-4°C. As desidratações foram realizadas em concentração crescente de etanol (20%, 50%, 70%, 80%, 90% e 2x 100%) em banho de gelo. A embebição com a resina epoxy foi iniciada com a mistura de etanol e resina Epon (*Electron Microscope Science*) na proporção de 1:1 à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação contínua, seguida 3 trocas de resina Epon pura (*Electron Microscope Science*) por 1 hora cada, sendo a uma última delas pelo período de 12h. As células aderidas foram incluídas em resina pura e mantidas em estufa a 60°C, durante 72 horas. Foram obtidos cortes ultrafinos de 70nm coletados em grades de cobre e pós-contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As observações e as capturas das imagens digitais foram realizadas no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G² Spirit BioTWIN (LME).

3.8 Cultivo de células uNK em meio suplementado com hormônios gonadotrofina coriônica, progesterona e estradiol

As frações celulares isoladas nos gradientes de Percoll a 30 e 40% obtidas conforme protocolo descrito no item 3.3.2 foram suspensas na proporção de 3×10^4 células em 30 μ L do meio RPMI condicionado com 150ng/mL de IL-15, 10% Soro Fetal Bovino e 1% da solução de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). A este meio foram adicionadas isoladamente ou em combinações: o hormônio gonadotrofina coriônica (hCG - human chorionic gonadotrophin - Sigma, St Louis, USA) na concentração de 1IU/mL; - a progesterona (P - Sigma, St Louis, USA) na concentração de 10^{-5} M e; - o estradiol (E - Sigma, St Louis, USA) na concentração de 10^{-8} M. As soluções dos hormônios progesterona e estradiol foram preparadas em dimetil-sulfoxido (DMSO, Sigma, St Louis, USA) nas concentrações limites que possibilitem a adição de um volume não superior a 2 μ L no volume final de 30 μ L do meio de cultivo.

A suspensão celular de 3×10^4 células em 30 μ L do meio RPMI condicionado e adicionado com os hormônios foram depositadas na forma de *microspot* sobre as cavidades das lâminas com película de máscara epoxy, previamente tratadas com fibronectina e, mantidas em estufa a 37°C com 5% de tensão de CO₂. Após 6h de cultivo, o meio de cultivo foi renovado junto com a remoção de células não aderidas e rompidas. As observações a fresco das células foram realizadas em microscópio invertido com contraste de fase (Nikon, Japão) em intervalos de 24h durante 5 a 9 dias.

De um conjunto de 3 testes independentes nas condições acima foram coletados após 24h de cultivo, tanto os sobrenadantes quanto as células foram imediatamente congeladas e mantidas a -80°C para posterior análise.

Para avaliar o comportamento das células uNK em cultivo sob o efeito dos hormônios foram realizados o vídeo monitoramento de 3×10^4 células uNK em 100µL de meio de cultivo semeadas em lâmina com câmara de cultivo (Nunc™ 178599 Lab-Tek® *Chamber Slide™ System, Glass, 16-Well*) em leitora de microplaca *Cytation™ 5*. As imagens foram coletadas em intervalos de 15 minutos no período de 1 a 24 hs iniciais do cultivo.

3.9 Ensaios funcionais das células uNK desafiadas na atividade citolítica/citotóxica

Foram realizados os ensaios de desafio funcional das células uNK desafiadas com lipopolissacarídeo de parede bacteriana (LPS), líquido amniótico coletado dos sítios de desenvolvimento embrionário de camundongos e, co-cultura com linhagens de células embrionárias (E14Tg2A) estabelecidas de camundongos. Para estes ensaios, foram utilizadas células uNK obtidas conforme descrito em 3.3.2, suspensas em meio de cultivo condicionado, com adição dos hormônios conforme descrito em 3.8. Para estes ensaios, o cultivo das células uNK foram realizadas em lâmina com 16 câmaras de cultivo (Nunc™ 178599 Lab-Tek® *Chamber Slide™ System, Glass, 16-Well*)

3.9.1 Desafio com LPS

Células uNK obtidas conforme descrito em 3.3.2 foram suspensas em meio de cultivo condicionado, com adição dos hormônios (CG, P, E) conforme descrito em 3.8. Foram semeadas 3×10^4 células/câmara e após 6 horas de cultivo, o meio de cultivo foi substituído contendo 5µg/ml de LPS (Sigma, St Louis, USA) de acordo com Kanevskiy e colaboradores (2013). Após 24 horas foram avaliadas à fresco ao microscópio invertido de contraste de fase. Após coleta do sobrenadantes, as células aderidas foram tripsinizadas, coletas e lavadas por centrifugação. Tanto o sobrenadante quanto as células foram imediatamente congeladas e armazenadas a -80°, até o ensaio subsequente.

3.9.2 Desafio com líquido amniótico

Células uNK obtidas conforme descrito em 3.3.2 foram suspensas em meio de cultivo condicionado, com adição dos hormônios (CG, P, E) conforme descrito em 3.8. Foram semeadas 3×10^4 células/câmara e após 6 horas de cultivo, o meio de cultivo foi substituído contendo 10% de líquido amniótico coletados dos sítios de desenvolvimento embrionário no 12º dg de camundongos (vide descrição da coleta abaixo). Após 24 horas foram avaliadas à fresco ao microscópio invertido de contraste de fase. Após coleta do sobrenadantes, as células aderidas foram tripsinizadas, coletas e lavadas por centrifugação. Tanto o sobrenadante quanto as células foram imediatamente congeladas e armazenadas a -80° , até o ensaio subsequente.

O líquido amniótico utilizado neste ensaio foi obtido de sítios de desenvolvimento embrionário de camundongos no 12º dg. As fêmeas gestantes foram sacrificadas por deslocamento cervical e imediatamente laparotomizadas. O útero foi cuidadosamente dissecado expondo os sítios embrionários. Com o auxílio de capilares de vidro a membrana amniótica de cada sítio foi perfurada e o líquido amniótico cuidadosamente aspirado e transferidos para microtubos. Após centrifugação a 250g, o sobrenadante foi transferido para microtudo e imediatamente congelado e mantido a -80°C . Um “pool” de líquido amniótico coletado de 3 animais diferentes foram utilizados nos ensaios de desafio com o líquido amniótico.

3.9.3 Co-cultivo com células embrionárias E14Tg2A

A linhagem embrioblástica E14Tg2A obtida pelo Dr. Joshua Brickman (Centre Development in Stem Cell Biology, Institute for Stem Cell Research, School of Biological Sciences, University of Edinburgh) deriva de 129 estirpes/Ola de blastocistos murinos (HOOPER et al., 1987). Estes embrioblastos não dependem de células *feeders* são mantidas indiferenciadas e proliferam em meio *Glasgow Modified Eagle's Medium* (GMEM - Sigma, St Louis, USA), com 1000 U/mL de fator inibidor de leucemia (LIFESGRO-LIF; ChemiconMillipore) 0.1 mM β -mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA), 1% da solução de Penicilina/Estreptamicina (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco)e 15% v/v de soro fetal bovino (Cultilab).

Para os ensaios de co-cultura as células E14TG2 foram coletadas após tripsinização e ressuspendidas em meio DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 0,1mM β -mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA GIBCO), 1% da solução de Penicilina/Estreptamicina (Gibco); 2 mM L-glutamina (GIBCO); 20% v/v de

soro fetal bovino (FBS - GIBCO) isenta de LIF. A ausência do LIF desbloqueia a inibição da diferenciação das E14TG2.

As células uNK obtidas conforme descrito em 3.3.2 e em meio suplementados com hormônios CG+P+E conforme descrito em 3.8 foram submetidas ao co-cultivo com a linhagem E14Tg2A na proporção de 1:1. Dessa forma, 3×10^4 células E14Tg2A foram semeadas simultaneamente com 3×10^4 células uNK nas câmaras da lâmina de cultivo (Nunc™ 178599 Lab-Tek® *Chamber Slide™ System, Glass*, 16-Well). As células foram mantidas em co-cultivo durante 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Como controles, foram realizadas culturas isoladas de células uNK (3×10^4 células) e de células E14Tg2A (3×10^4 células) em meio condicionado contendo IL-15 e suplementados pelos hormônios CG+P+E. Após este período os sobrenadantes foram coletados, congelados e armazenados a -80°.

As observações do comportamento dessas células em co-cultura foram realizadas em microscópio invertido com contraste de fase (Olympus, Japão).

3.10 Quantificação de proteína total

A concentração proteica das amostras obtidas dos sobrenadantes e células nos protocolos descritos em 3.8 e 3.9 foram determinadas pela técnica de BCA utilizando o kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher) de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante. Todas as amostras foram diluídas 12,5 vezes em água deionizada.

3.11 Imunoensaio Multiplex

Foi adotado este método de análise do comportamento funcional das células uNK *in vitro*, pela possibilidade de avaliar múltiplos parâmetros em substratos com disponibilidade de volume e concentração limitada.

Para as amostras de células e/ou sobrenadantes de cultivo e co-cultivo de células uNK obtidas nos experimentos de 3.8 e 3.9 foram priorizadas as avaliações das expressões de TNF- α , IFN- γ , Granzima B, IL-10 e VEGF em kit personalizado preparado pela R&D Systems (*Luminex® Assay-Mouse Premixed Multi-Analyte Kit — LXSAMS*) para análise no equipamento Imunoensaio Multiplex modelo Bio-plex 200, Bio-Rad (LACTAD-Unicamp)

Para a análise das células, estas foram lisadas utilizando disruptor de células ultrassônico VirSonic 60 (Virtis) durante 30 segundos. Tanto os sobrenadantes quanto as células

lisados por sonicação foram centrifugadas a 10.000g durante 15 minutos para sedimentação de detritos celulares. Em alíquotas de 50µL destes sobrenadantes foram adicionadas 50µL da solução RD6-52 e 50µL da solução de micropartículas com os marcadores (anticorpos primários) específicos diluídas em solução RD1Wa e transferidas nas cavidades da microplaca (96 cavidades). Estas amostras foram incubadas durante 2hs sob agitação contínua.

Após incubação, a placa foi lavada 3x com solução tampão de lavagem em dispositivo de coletor à vácuo. Em seguida, foram adicionados 50µL das soluções de anticorpos (secundários) biotinilados diluídos na solução RD1W em todos os poços. A placa foi coberta com um selador de placa e incubado por 1h à temperatura ambiente no agitador de microplaca a 500 rpm. Após a segunda incubação, a placa foi novamente lavada conforme descrito anteriormente. Após a segunda lavagem, foram adicionados 50 µL de estreptavidina-PE diluída na solução RD1W em todos os poços. A placa foi coberta novamente com um novo selador de placa e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente no agitador de microplaca a 500 rpm. Após uma terceira lavagem, as micropartículas foram então ressuspensas em 100µL de solução tampão de lavagem durante 2 minutos à temperatura ambiente em agitador de microplaca a 500 rpm. A placa foi analisada no Imunoensaio Multiplex modelo Bio-plex 200 Bio-Rad. Todos os procedimentos desde o preparo das amostras e os reagentes foram realizados conforme instruções do fornecedor do kit do ensaio multiplex (Luminex® *Assay-Mouse Premixed Multi-Analyte Kit* – R&D Systems – LXSAMS).

3.12 Análises estatísticas.

Para análise dos dados dos analitos específicos 3.11, foi adotado a razão entre os dados obtidos no imunoensaio multiplex e a concentração de proteínas totais para correção dos dados de cada amostra (proteína específica/proteína total – pg/ml).

Para comparação estatística de grupos independentes, os dados foram analisados pelo método test-T seguido do teste *Mann-Whitney*. Para comparação entre os grupos dependentes, a análise foi realizada pelo teste não paramétrico de *Friedman* seguido do teste *Dunn* entre pares selecionados. Para as análises de co-cultura, foram utilizados os testes *Friedman* seguido do teste *Dunn* entre todos os pares e test-T seguido do teste *Wilcoxon* para pares combinados.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão do receptor de hormônio gonadotrofina coriônica (CGR) no útero gestante de camundongos

As reações controles realizadas para a reação imunocitoquímica do receptor de hormônio gonadotrofina coriônica (CGR) realizadas no ovário de camundongos gestantes (9ºdg) apresentaram reação positiva nas células do corpo lúteo (Fig 1) em padrão difuso no citoplasma destas células (Fig 1A,C). O útero de camundongos no 9ºdg apresentou extensa reação positiva no endométrio tanto da região mesometrial quanto antimesometrial, notadamente em padrão difuso no citoplasma das células decíduais (Fig 1B,D). Pela dupla marcação com a lectina DBA e anti-CGR constatou-se que células uNK DBA⁺ apresentam também marcação positiva para CGR (Fig 1E,F).

4.2 Isolamento e purificação de células uNK

As células em suspensão no meio RPMI obtidas da dissecação da região do MLAp dos sítios uterinos de desenvolvimento embrionário no 9ºdg quantificadas em câmara de Neubauer apresentam o rendimento médio de $2,8 \times 10^5$ células viáveis/animal gestante para uma média de 8 sítios de desenvolvimento embrionário (tabela 1).

Tabela 1- Quantificação de células obtidas nos procedimentos de isolamento de células uNK da região mesometrial do útero gestante de camundongos no 9ºdg

	Média de células isoladas/animal	Média de células isoladas/sítio uterino
Suspensão celular obtida da região mesometrial	$2,8 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4 \pm 5,7 \times 10^2$
Células isoladas pelo biomagneto conjugado com lectina DBA	$6 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$
Células isoladas pelo gradiente de Percoll	$1,7 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^3$
Células isoladas pelo biomagneto conjugado com lectina DBA + gradiente de Percoll	$3,5 \times 10^4 \pm 5 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3 \pm 3,7 \times 10^2$

Esta suspensão celular quando utilizadas para isolamento de células uNK DBA⁺ por meio de esferas biomagnéticas conjugadas com lectina DBA, resultaram em 5 a 7x10³ células/sítio ou 6x10⁴ células uNK DBA⁺ por animal contendo em média 8 sítios de implantação embrionária. Cumpre salientar que por este método de isolamento de células uNKDBA⁺, ocorre o carregamento de grande quantidade de hemácias provavelmente atraídos junto com as esferas magnéticas pelo campo magnético gerado pelo MPC.

O fracionamento da suspensão celular em gradientes de Percoll de 20, 30, 40 e 70% resultaram em células com características morfológicas variadas de acordo com o gradiente. O gradiente de menor densidade (20%) apresentou células grandes de contorno irregular e restos de células rompidas, ao lado de células esféricas volumosas e com citoplasma granuloso em menor proporção. As frações coletadas dos gradientes de 30% e 40% apresentaram células íntegras, de formato esférico com citoplasma granuloso sendo as maiores, predominantes na concentração de 30% e as menores predominantes no gradiente de 40% (Fig 2). Na fração coletada no gradiente de 70% abaixo da interface com o gradiente de 40% foram encontrados apenas células pequenas sem granulosidade citoplasmática em e em pequena proporção se comparada aos gradientes de 30% e 40%. No gradiente de 70% foi constatado a formação de um sedimento avermelhado constituído essencialmente de hemácias, visível a olho nu. A quantificação das células da fração 30% e 40% apresentaram um rendimento entre 12 e 20x10⁴ células, ou a média de 15x10⁴ células/sítio de desenvolvimento embrionário.

A imunofenotipagem realizada pela citometria de fluxo do conjunto das células isoladas na fração de 30 e 40% no gradiente de Percoll, demonstraram a ocorrência de 12,3% de células NK1.1⁺, 71% de células DBA⁺ e 12,87% de células NK1.1⁺DBA⁺, totalizando 92% de células com imunofenótipos de células uNK de camundongos. As células CD3⁺ constituem uma proporção menor que 0,2% de leucócitos nestas frações de 30 e 40% do gradiente de Percoll (Fig 3).

O experimento de purificação das células uNKDBA⁺ isoladas pelos biomagnetos conjugados com lectina DBA (6x10⁴ células) nos gradientes de 20, 30, 40 e 70% de Percoll resultaram na média de 3x10⁴ células na somatória das frações dos gradientes de 30 e 40%. Na fração de 70% não foram recuperadas células em quantidade significativas (< 1x10³) e no sedimento foram constatadas hemácias e esferas magnéticas. Na fração de 20% foram constatadas predominantemente células não globosas ou rompidas.

4.3 Testes de cultivo primário de células uNK em *microspots*

Visando os ensaios funcionais subsequentes das células uNK isoladas por meio do gradiente de Percoll 30 e 40%, estas frações celulares foram cultivadas em *microspot* na concentração de $3 \times 10^4/30\mu\text{L}$.

O cultivo do *microspot* nas lâminas de vidro acopladas com câmaras de cultivo pré-revestidas com fibronectina e recobrimento com óleo mineral, conforme preconizada por Croy et al. (2010), apresentaram células sedimentadas e tenuemente aderidas à superfície da lâmina nos períodos de 6 e 24 horas. Nestas condições, a maioria das células apresentavam aspecto globoso, de tamanhos variados e com o citoplasma granuloso concentrados na área central do *microspot*. A aspiração e renovação do meio de cultivo realizada com capilares de vidro e micromanipulador sob observação ao microscópio estereoscópico, pode ser realizada desde que se atente em não promover um fluxo muito intenso dos meios de cultivo aspirados ou introduzidos durante os procedimentos.

Inicialmente procurou-se padronizar os métodos de preservação das células uNK aderidas à superfície dos dispositivos de cultura para análise citoquímica e imunocitoquímica comparativa nos ensaios funcionais. Os diversos procedimentos testados visando a estabilidade e preservação das células em cultivo nos experimentos subsequentes, demonstraram que a cobertura com óleo mineral sobre os cultivos de *microspot* demandam lavagens extensivas para a remoção deste óleo, resultando em redução drástica de células remanescentes para análises subsequentes.

Desta dificuldade de remover o óleo mineral, foi testado o cultivo de células uNK na concentração de 3×10^4 células no volume de $30\mu\text{L}$ nos poços de lâminas delimitadas por máscara de epoxy em iguais condições das lâminas com câmaras, mas sem a cobertura de óleo mineral (Fig 4 A,B). As observações sob o microscópio estereoscópico durante 6h, 24 e 48h apresentaram células globosas, integras, aderidas ao substrato de fibronectina à semelhança do cultivo em lâmina com câmara de cultivo. O cuidado no manuseio quanto à intensidade do fluxo do meio durante os movimentos de aspiração e adição do meio necessitou de igual cuidado, sob o risco de destacar e romper as células aderidas. Contudo a ausência da cobertura de óleo mineral, facilitou os manuseios nos experimentos subsequentes, sem aparente prejuízo na morfologia das células em cultivo.

4.4 Testes para retenção e preservação das células uNK em cultivo

Os testes para retenção e preservação das células uNK aderidas nas superfícies dos dispositivos de cultivo revestidos por fibronectina, demonstraram que a cobertura com o óleo mineral exigia lavagens extensivas para a remoção completa do óleo. Estas lavagens reduziam drasticamente as células aderidas para posterior análise. Mesmo nos cultivos de *microspot* sem a cobertura do óleo mineral, a adesão apenas focal das células uNK que preservavam a sua forma esféricas sobre o substrato de fibronectina resultava na ruptura da maioria destas células durante os procedimentos subsequentes de manipulação visando a sua preservação para observações ao microscópio.

Nas células uNK cultivadas em *microspot* com cobertura de óleo mineral ou em lâminas de reação com máscara epoxy sem a cobertura do óleo mineral, o BSA 1% auxiliou na adesão das células ao substrato de fibronectina, porém a quantificação de células era variável, não sendo possível a realização de um protocolo reproduzível para todos os ensaios, enquanto que os testes com BSA 7%, gelatina 1% e 3% mantinham poucas ou nenhuma célula aderida. Pelos resultados dos nossos ensaios, verificou-se que o plasma sanguíneo do próprio animal apresentou melhores resultados mantendo e preservando as células uNK durante o processo de reação citoquímica (Fig 4 C,D).

4.5 Efeito dos hormônio gonadotrofina coriônica, progesterona e estradiol na sobrevivência das células uNK *in vitro*

As células uNK cultivada em *microspot* no meio de cultivo condicionado com IL-15 e aderidas na lâmina revestida com o substrato de fibronectina apresentaram nas primeiras 24h, células uNK globosas de dimensões variadas sendo predominante as menores (10-15 μ m) de conteúdo citoplasmático pouco granuloso, tanto nos meios sem (controle I) e com DMSO (controle II) (Fig 5). As células uNK maiores (>20 μ m) apresentavam o citoplasma com maior granulosidade. Em meio a células íntegras foram observadas pequenas estruturas esféricas anucleadas (< 5 μ m) igualmente aderidas na superfície da lâmina revestida com substrato de fibronectina e, de conteúdo granuloso semelhante ao do citoplasma das células uNK. Nas observações em maior aumento observou-se frequentemente a formação de brotamentos citoplasmáticos esféricas na superfície das células uNK maiores, pelo que se presume serem as estruturas esféricas anucleadas originadas de fragmentos citoplasmáticos das células uNK.

No período de 48h, verificou-se que a maioria das células uNK mantinham se íntegras, com predomínio de células menores e aumento das estruturas esféricas aderidas no substrato de fibronectina. O acompanhamento do comportamento das células uNK em observações diárias com a substituição do meio de cultivo, demonstraram que após 72 h ocorre uma gradual redução de células aderidas, com aumento de fragmentos de células rompidas flutuantes no meio de cultivo, sendo ao final de 120h apenas algumas poucas células íntegras remanescentes (Fig 6). A redução gradual da proporção de células uNK ao longo dos períodos de cultivo pode ser decorrente em parte da ruptura mecânica durante a manipulação diária para a substituição do meio de cultura, mas também pela morte gradual das células nestas condições de cultivo. Não foram constatadas diferenças entre os meios de cultivo contendo ou não DMSO utilizado para solubilização dos hormônios esteroides P e E. Estes parâmetros foram considerados como sendo o de cultivo padrão das células uNK conforme estabelecidos originalmente por (BIZINOTTO et al., 2014; CROY et al., 2014).

A suplementação do hormônio gonadotrófico coriônico (CG) no meio de cultivo apresentou predomínio de células globosas maiores ($> 20\mu\text{m}$) de citoplasma granuloso nas primeiras 24h, se comparada com as células em cultivo sem a suplementação do CG. Foram identificadas igualmente as estruturas esféricas de conteúdo granuloso correspondente a brotamentos citoplasmáticos das células uNK (Fig 5). Após 48h, foram constatadas aumento na proporção de brotamentos citoplasmáticos aderidas ao substrato ao lado de células uNK maiores com citoplasma granuloso se comparada ao período anterior de 24h. Nas observações dos período subsequentes de 72, 96 e até 120h não se constatou redução visível de células globosas de citoplasmas granuloso e de aspecto íntegro aderidas ao substrato. Nos períodos subsequentes houveram redução gradual de células íntegras aderidas, sendo poucos remanescentes ao final de 144h (Fig 6).

A suplementação do hormônio progesterona (P) no meio de cultivo apresentaram predomínio de células globosas maiores ($> 20\mu\text{m}$) de citoplasma granuloso nas primeiras 24h, se comparada com as células em cultivo sem a suplementação do CG (Fig 5). Após 48h, verificou-se uma tendência na redução nas células aderidas com predomínio de células menores de citoplasma granuloso. Nas observações dos períodos subsequentes constatou-se uma gradual redução de células aderidas no substrato de fibronectina, sendo poucas remanescentes ao final de 144h (Fig 6).

A suplementação do hormônio estradiol (E) no meio de cultivo não apresentaram diferenças no comportamento das células em relação ao cultivo padrão. Foram identificadas células uNK globosas de dimensões variadas sendo predominante as menores ($10\text{-}15\mu\text{m}$) de

conteúdo citoplasmático pouco granuloso (Fig 5). As células uNK maiores ($>20\mu\text{m}$) apresentavam o citoplasma com maior granulosidade. Em meio a células íntegras foram observadas pequenas estruturas esféricas anucleadas ($<5\mu\text{m}$) igualmente aderidas na superfície da lâmina revestida com substrato de fibronectina e, de conteúdo granuloso semelhante ao do citoplasma das células uNK. Após 48 e 72h, houve uma redução visível na proporção de células aderidas, sendo estas em maior proporção de células menores (Fig 5). Nos períodos subsequentes de cultivo verificou-se uma redução gradual na proporção de células aderidas, sendo encontradas poucas células remanescentes ao final de 120h (Fig 6).

A suplementação combinada dos hormônios CG e P no meio de cultivo das células uNK resultaram na melhor preservação das células aderidas tanto das formas maiores quanto das pequenas nos períodos de 24 e 48h (Fig 5). Nestas condições, a preservação das células aderidas foi mais duradoura se comparada ao controle, persistindo as células íntegras até 216h de cultivo (Fig 6).

A suplementação combinada dos hormônios CG e E no meio de cultivo das células uNK não apresentaram diferenças nas primeiras 24h, porém aumentaram a proporção de células aderidas no período de 48h se comparadas com os cultivos controles ou com suplementação apenas de E, com o predomínio de células menores ($<20\mu\text{m}$). As observações nos períodos subsequentes demonstraram redução gradual de células aderidas, sendo poucas remanescentes após 192h (Fig 6).

A suplementação combinada dos hormônios P e E no meio de cultivo das células uNK demonstraram a preservação tanto de células pequenas agranulares quanto as maiores com citoplasma granuloso após 24h de cultivo (Fig 5). Após 48h, a proporção de células aderidas era visualmente maior em relação aos de cultivos controles, assim como ao do E isolado, mas semelhantes ao do P isolado. As observações subsequentes demonstraram gradual e rápida redução na proporção de células aderidas, restando poucas remanescentes ao final de 192h (Fig 6).

A suplementação combinada dos hormônios CG, P e E no meio de cultivo das células uNK demonstraram a preservação de maior proporção tanto de células pequenas agranulares quanto as maiores com citoplasma granuloso após 24h de cultivo (Fig 5; Fig 7). Após 48h, a proporção de células aderidas era consideravelmente maior em relação aos cultivos controles ou mesmo com os hormônios isolados (Fig 5). Nestas condições, a preservação de células aderidas foi mais duradoura se comparada ao controle e aos de hormônios isolados persistindo até 216h de cultivo (Fig 6).

A análise ultraestrutural das células aderidas cultivadas sob o efeito do CG, apresentam morfologia semelhante ao descrito previamente por Paffaro e colaboradores (2003), com núcleo amplo de cromatina pouco condensada e citoplasma contendo cisternas de retículo endoplasmático, mitocôndrias com projeções tubulares da membrana interna e grânulos citoplasmáticos de densidade e dimensões variadas. As vesículas coletadas do sobrenadante do cultivo, apresentam conteúdo de citoplasma delimita por membrana plasmática, no qual se destacam diversas estruturas eletrodensas de formato e dimensões variadas cujo interior apresentam arranjos em figuras de mielina (fig 7a,b). Ao lado destas estrutura vesiculares eletrodensas estão presentes vesículas de conteúdo eletrolucente e algumas mitocôndrias com projeções tubulares da membrana interna, ao lado de pequenos segmentos de retículo endoplasmático (Fig 7c,d).

4.6 Expressões de TNF- α , Granzima B, VEGF, IL-10 e IFN- γ das células uNK sob efeito dos hormônios gonadotrofina coriônica, progesterona e estradiol *in vitro*

A concentração de proteínas totais avaliadas tanto do sobrenadante quanto das células aderidas em cultivo sob a ação dos hormônios CG, P e E obtidas pelo método BCA estão tabuladas na tabela 2.

Tabela 2. Concentração de proteínas totais dos sobrenadantes e células em meio de cultivo suplementado com hormônios

SOBRENADANTE									
	C1	C2	E	P	CG	E+P	E+CG	P+CG	E+P+CG
A1	2,85	4,3	3,45	5,22	4	3,63	5,88	4,95	3,02
A2	2,63	4,22	3,63	3,97	2,75	2,83	2,8	5,07	5,07
A3	2,65	4,45	4,12	4,77	3,47	2,87	3,98	1,34	3,37

CÉLULAS									
	C1	C2	E	P	CG	E+P	E+CG	P+CG	E+P+CG
A1	4,45	3,25	4,55	3,77	6,41	2,02	2,38	2,78	4,5
A2	2,73	2,42	2,52	3,32	2,4	2,95	2,18	2,72	2,78
A3	2,93	2,8	3,37	2,42	2,95	2,8	2,12	3,35	2,4

Os valores tabulados correspondem às concentrações em 10^{-9} pg/ml. A1, A2 e A3 - correspondem às 3 amostras coletadas de culturas independentes; C1- Controles sem DMSO; C2 – Controles com DMSO; E – Estradiol; P – Progesterona; CG – Hormônio Gonadotrofina coriônica.

As expressões de TNF- α , IL-10, Granzima B, VEGF e IFN- γ das células uNK em cultivo sob o efeito dos hormônios, determinadas por meio do imunoenensaio multiplex e ajustadas de acordo com a concentração proteica das respectivas amostras estão tabuladas na tabela 3.

Tabela 3. Concentrações de TNF- α , Granzima, VEGF, IL-10 e IFN- γ

SOBRENADANTE										
		C1	C2	E	P	CG	E+P	E+CG	P+CG	E+P+CG
TNF- α	A1	2,3	0	0,51	0	1,4	0,49	0,39	4,48	0
	A2	0,45	0	0	0	1,21	1,26	12,3	4,12	0
	A3	2,63	0	0,08	0,02	1,3	0,3	1,49	4,36	0,16
IL-10	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	0	0	0	0	0	0	0,8	0	0
	A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GranB	A1	24,5	12	9,26	3,91	26,4	0,78	1,25	5,4	16,4
	A2	4,47	7,33	5,02	5,67	9,71	1	1,01	4,02	6,1
	A3	40,6	20	13	24,7	17,2	3,34	2,4	13,6	39
VEGF	A1	1,63	0,36	1,09	9,45	1,03	0,22	0,13	0,37	0,56
	A2	0,64	0,28	0,36	0,33	0,57	0,37	0,38	0,41	0,21
	A3	2,19	0,29	0,32	0,57	1,12	0,19	0,14	1,85	0,31
IFN- γ	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CÉLULAS										
		C1	C2	E	P	CG	E+P	E+CG	P+CG	E+P+CG
TNF- α	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-10	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GranB	A1	0	3,62	2,11	4,3	0,07	6,9	0	0	0,1
	A2	8,6	1,17	0,17	4,2	0	0,15	0,2	0,16	0
	A3	11,2	0	4,78	0	0,96	0	0	0,49	0
VEGF	A1	0,06	0,05	0,12	0,01	0,08	0,28	0,02	0,11	0,06
	A2	0,11	0,23	0,02	0,17	0	0,11	0,43	0,3	0
	A3	0,15	0	0,24	0,13	0,11	0,11	0,14	0,13	0,02
IFN- γ	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Os valores tabulados correspondem às concentrações em 10^{-9} pg/ml, corrigidos de acordo com as respectivas concentrações proteicas. A1, A2 e A3 - correspondem às 3 amostras coletadas de culturas independentes; C1- Controles sem DMSO; C2 – Controles com DMSO; E – Estradiol; P – Progesterona; CG – Hormônio Gonadotrofina coriônica.

A expressão do TNF- α foi detectada nos sobrenadantes, porém não nas células aderidas da cultura. As concentrações do TNF- α nos sobrenadantes de cultura sob o efeito dos hormônios E, P e CG isolados e, na combinação P+E foram menores em relação ao controle (Fig 8). O efeito combinado de E+CG e P+CG apresentaram aumento na concentração do TNF- α se comparada ao controle e em relação aos hormônios isolados. Já a combinação dos três hormônios CG, P e E demonstrou redução na expressão do TNF- α .

A Granzima B foi detectada tanto no sobrenadante quanto nas células aderidas do cultivo controle com e sem o DMSO, sendo menor na presença do DMSO (Fig 8). Sob o efeito dos hormônios P, E a expressão da Granzima B não apresentou variações tanto nas células aderidas quanto no sobrenadante das culturas. A combinação P+E apresentou concentração semelhantes aos destes hormônios isolados, porém constatou-se uma diminuição no sobrenadante. Sob o efeito do CG e suas combinações CG+E e CG+P ocorreram reduções significativas nas células em cultivo. Nos sobrenadantes destas culturas verificou-se a presença da Granzima B sob o efeito do CG, porém diminuídas nas combinações CG+E e CG+P (Fig 8). Na combinação dos três hormônios CG+P+E, a expressão da Granzima B na célula aderida foi baixa, semelhante aos dos hormônios CG isolado ou em combinações com CG+E e CG+P. No sobrenadante, a combinação dos hormônios CG+P+E apresentou níveis de granzima B semelhante ao do controle e significativamente maior em relação às combinações de CG+E, CG+P e E+P.

O VEGF foi detectado nas células uNK aderidas cultivadas em meio condicionado padrão e em níveis semelhantes nos demais meios contendo isoladamente os hormônios P, E e CG ou, em combinações binárias destes (Fig 8). Redução significativa na expressão do VEGF nas células aderidas foi observado na combinação dos três hormônios CG+P+E se comparada com o controle e demais condições de cultivo. O VEGF foi detectado no sobrenadantes dos cultivos controle de células uNK, sendo observado redução significativa nos meios contendo os hormônios CG, E e suas combinações. No sobrenadante do cultivo sob o efeito da P verificou-se um aumento na concentração do VEGF se comparado ao controle e com as demais culturas suplementadas com os hormônios CG e E.

As citocinas IFN- γ e IL-10 não foram detectadas no limiar de sensibilidade do método utilizado (tabela 3).

4.7 Ensaios funcionais das células uNK em meio condicionado suplementado com hormônio gonadotrófico coriônico

As células uNK em meio de cultivo suplementadas com os hormônios CG+P+E foram desafiadas *in vitro* frente aos estímulos de LPS (lipopolissacarídio), líquido amniótico e células embrionárias de camundongos (E14Tg2A). As variações nas expressões de TNF- α , Granzima B, VEGF, IL-10 e IFN- γ no período de 24hs de cultivo foram avaliadas tanto no sobrenadante quanto nas células aderidas do cultivo, exceto nas células uNK aderidas em co-cultivo com as células E14Tg2A. As concentrações proteicas de cada uma das amostras estão tabuladas na tabela 4, os quais foram utilizadas para o ajuste dos valores obtidos nos ensaios multiplex dos analitos avaliados (tabela 5).

Tabela 4. Concentração de proteínas totais dos sobrenadantes e células uNK nos ensaios funcionais

SOBRENADANTE			
	uNK	LPS	LA
A1	3,93	6,02	7,08
A2	4,05	4,48	4,15
A3	3,88	4,22	3,68

	uNKD	Tg2A	uNKD+Tg2A
A1	6,91	3,9	7,1
A2	6,75	5,08	8,16
A3	7,13	5,33	5,92

CÉLULAS			
	uNK	LPS	LA
A1	3,23	2,73	2,15
A2	3,48	2,08	2,63
A3	3,28	3,12	4,68

Os valores tabulados correspondem às concentrações em 10^{-9} pg/ml. A1, A2 e A3 - correspondem às 3 amostras coletadas de culturas independentes; uNK – células uNK; LPS – lipopolissacarídio; LA – Líquido amniótico; uNKD – células uNK cultivadas em meio Dmem; Tg2A – células E14Tg2A.

Tabela 5. Concentrações de TNF- α , Granzima, VEGF, IL-10 e IFN- γ das células uNK nos ensaios funcionais

SOBRENADANTE				
		uNK	LPS	LA
TNF- α	A1	0,65	0,29	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0
IL-10	A1	0	0	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0
GranB	A1	5,18	3,1	6,41
	A2	2,37	4,5	4,91
	A3	3,87	1,7	3,49
VEGF	A1	0,33	0,11	0,22
	A2	0,32	0,38	0,38
	A3	0,17	0,19	0,42
IFN- γ	A1	0	0	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0

CÉLULAS				
		uNK	LPS	LA
TNF- α	A1	0	0	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0
IL-10	A1	0	0	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0
GranB	A1	0,87	4,3	13,4
	A2	0,81	33,5	3,64
	A3	2,24	3,07	4,35
VEGF	A1	0,17	0,48	0,38
	A2	0,23	0,63	0,11
	A3	0,05	0,06	0,14
IFN- γ	A1	0	0	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0

SOBRENADANTE				
		uNKD	Tg2A	uNKD+Tg2A
A1	A1	0	0	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0
A2	A1	0	0	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0
A3	A1	0,41	0	2,27
	A2	0	0	1,44
	A3	1,95	0	5,22
A4	A1	0,19	15	5,38
	A2	0,06	0,11	0,17
	A3	0,15	12	6,01
A5	A1	0	0	0
	A2	0	0	0
	A3	0	0	0

Os valores tabulados correspondem às concentrações em 10^{-9} pg/ml, ajustados de acordo com as respectivas concentrações proteicas. A1, A2 e A3 - correspondem às 3 amostras coletadas de culturas independentes; uNK – células uNK; LPS – lipopolissacarídeo; LA – Líquido amniótico; uNKD – células uNK cultivadas em meio Dmem; Tg2A – células E14Tg2A.

Nas culturas de células uNK em meio suplementada com os hormônios CG+P+E sob a ação do LPS foram detectadas a presença de TNF- α , Granzima B e VEGF nos sobrenadantes da cultura (Fig 9). O TNF- α não foi detectado nas células aderidas do cultivo,

assim como, as citocinas IL-10 e IFN- γ não foram detectadas nos sobrenadantes ou nas células aderidas e por esta razão não foram ilustrados na forma de histogramas. No sobrenadante do cultivo submetido ao tratamento pelo LPS, a concentração do TNF- α foi menor em relação ao controle. A concentração de Granzima B nas células uNK aderidas do cultivo controle era significativamente menor em relação ao encontrado no sobrenadante. Na presença do LPS, a concentração de Granzima B era significativamente maior nas células aderidas em relação ao controle enquanto no sobrenadante, as concentrações se equiparam ao do controle. A expressão do VEGF foi detectada tanto no sobrenadante quanto nas células uNK aderidas do cultivo controle, sendo ligeiramente maior no sobrenadante (Fig 9). Sob o efeito do LPS, a expressão do VEGF nas células aumenta enquanto no sobrenadante são similares ao do controle.

Sob o efeito do líquido amniótico (LA), verificou-se a completa supressão da expressão do TNF- α tanto nas células uNK aderidas quanto no sobrenadante das culturas (Fig 10). As concentrações de Granzima B detectadas nas células aderidas foram maiores em relação ao controle e similares nos sobrenadantes. O VEGF foi detectado tanto nas células aderidas quanto no sobrenadante do cultivo, cujas concentrações foram similares aos encontrados no cultivo controle (Fig 10).

Pelo fato das células E14Tg2A não crescerem adequadamente em meio RPMI, nos ensaios de co-cultivo de células uNK e células embrioblásticas E14Tg2A foi utilizado meio de cultivo DMEM, portanto em meio de cultivo diferente dos realizados nos experimentos anteriores. Os testes de cultivo realizados com o meio DMEM suplementados com IL-15 em substrato de fibronectina, demonstraram que as células uNK promoveram a adesão e apresentaram sobrevida com preservação da morfologia semelhante àquelas cultivadas em meio RPMI condicionado. Os testes realizados com o meio condicionado suplementado pelos hormônios estradiol, progesterona e gonadotrofina coriônica não apresentaram diferenças no comportamento ou sobrevida das células uNK nos períodos iniciais de 24 a 72h se comparada com as observadas com o meio RPMI (dados não ilustrados).

Da mesma forma, a adição de hormônios CG, P e E não afetaram o padrão de proliferação e crescimento na forma de colônias de tamanhos variados das células E14Tg2A (Fig 11A,B). Dos resultados dos testes foi padronizado o meio DMEM condicionado contendo IL-5 em substrato de fibronectina, com suplementação dos hormônios CG+P+E nos ensaios de co-cultivo de células uNK e células E14Tg2A, na proporção de 1:1 cada qual contendo 3×10^4 células.

Na co-cultura de células uNK e células E14Tg2A após 24h em meio DMEM condicionado e suplementada com os hormônios CG+P+E, observou-se uma redução no

tamanho das colônias de células E14Tg2A (Fig 11C). Foram encontradas células uNK globosas maiores, íntegras e com citoplasma granuloso (Fig 11D). Foi observado a presença de alguns brotamentos na superfície das células uNK bem como fragmentos citoplasmáticos esféricos aderidas ao redor das colônias de células E14Tg2A (Fig 11D).

Na análise realizada através do imunoensaio para as células uNK, E14Tg2A e co-cultivo, não foram detectadas as citocinas TNF- α , IL-10 e IFN- γ tanto nos sobrenadantes quanto nas células aderidas e por esta razão não foram ilustrados na forma de histogramas. As concentrações de Granzima B detectadas no sobrenadante dos co-cultivos foi significativamente maior em relação ao controle e assim como esperado, não foi detectado Granzima B no cultivo de células E14Tg2A (Fig 12). O VEGF foi detectado em quantidades muito menores nas células uNK em relação as células E14Tg2A. Na análise de co-cultivo, os níveis de VEGF reduziram significativamente quando comparado ao cultivo de células E14Tg2A e maiores me relação ao cultivo de células uNK (Fig 12).

5.DISSCUSSÃO

As células uNK expressam receptores LH/CGR.

A reação imunocitoquímica positiva para receptores de LH/CGR identificadas especificamente nas células do corpo lúteo de camundongos gestantes (9ºdg) confirmam de um lado, a expressão destes receptores identificados pelo anticorpo anti-CGR utilizado no experimento e concomitantemente, a potencial ação primária preconizada da gonadotrofina coriônica (CG) secretadas pelos trofoblastos em prover a manutenção do corpo lúteo em substituição ao hormônio luteinizante (LH) hipofisário durante a primeira metade da gestação (SCHUMACHER; COSTA; ZENCLUSSEN, 2014; FAAS; DE VOS, 2017). As reações LH/CGR positivas nas células do estroma endometrial tanto da região mesometrial quanto antimesometrial, assim como, no miométrio do útero gestante de camundongos confirmam os relatos prévios da literatura (WIDE; WIDE, 1979; BONNAMY; BENHAÏM; LEYMARIE, 1990, 1993; ZHENG et al., 2001) da expressão extra-gonadal destes receptores.

A comprovação da reação positiva de LH/CGR nas células uNKDBA⁺ do presente estudo é um relato inédito, sugerindo uma potencial modulação parácrina do hormônio gonadotrófico coriônico (CG) nas respostas funcionais desempenhadas pelas células uNK na interface materno-fetal do útero gestante de camundongos. Baseado neste resultado inicial, foram aprimorados os procedimentos de isolamento e cultivo das células uNK de camundongos visando os experimentos para avaliação *in vitro* do efeito da CG sobre as células uNK.

Isolamento e cultivo primário de células uNK para ensaios *in vitro*

O isolamento e purificação de células uNKDBA⁺ de camundongos são procedimentos desenvolvidos originalmente em nosso laboratório baseado na afinidade seletiva da lectina *Dolichos biflorus* (DBA) pelas células uNK (PAFFARO et al., 2003; CROY et al., 2010). Estes procedimentos de isolamento, apesar de altamente específico resulta em rendimento médio de não mais que $8-10 \times 10^3$ células uNKDBA⁺/sítio de implantação embrionária, ou a média de $8-10 \times 10^4$ células de cada camundongo gestante no 8-9ºdg. Devido

a esta proporção reduzida de células isoladas, foram desenvolvidos os procedimentos de manipulação e cultivo *in vitro* em *microspot* destas células ($2\text{-}30 \times 10^3$ células) em $50\mu\text{L}$ de meio de cultivo utilizando câmaras de cultivo acopladas a lâminas histológicas e recobertas com óleo mineral (CROY et al., 2010).

Os resultados do presente experimento de isolamento de célula uNKDBA⁺ utilizando esferas magnéticas revestidas com lectina DBA corroboram com os dados de rendimento relatado por Croy e colaboradores (2010), atingindo a média de $8\text{-}10 \times 10^4$ células uNKDBA⁺ de cada animal gestante no 9ºdg. Contudo, em se estabelecendo o número mínimo de 3×10^4 células uNK para os ensaios funcionais subsequentes pretendidos no presente trabalho, constatou-se a necessidade de um grande número de animais para a realização de todos os ensaios *in vitro* pretendidos. Mais recentemente, o nosso laboratório desenvolveu o isolamento de células leucocitárias da região mesometrial de camundongos gestantes por meio de centrifugação em gradiente de Percoll (BIZINOTTO et al., 2014), pelo qual, as frações dos gradientes de 30 e 40% do Percoll concentram a maioria das células uNK do útero gestante de camundongos, não limitados à afinidade pela lectina DBA. Os nossos resultados demonstram que neste procedimento, atinge-se o rendimento superior a 20×10^4 células uNK NK1.1⁺ de cada animal, com contaminações de outros leucócitos inferiores a 5%, dentre os quais a maioria sendo de células CD3⁺. Cumpre salientar que apesar da grande afinidade das células uNK de camundongos para com a lectina DBA detectadas em reações citoquímicas nos sítios de implantação embrionária, nem todas as células uNK são DBA⁺ (YADI et al., 2008; MALLIDI et al., 2009; CROY et al., 2010). Ou seja, presume-se que o isolamento pelo gradiente do Percoll resulte na maior representatividade de células uNK não restritas ao fenótipo uNKDBA⁺ presentes no útero gestante de camundongos.

Por outro lado, todas e quaisquer manipulações destas células resultam na rompimento e lise celular, o que dificulta ou inviabiliza as análises como por exemplo, pelos métodos citoquímicos ou imunocitoquímicos. O recobrimento dos cultivos em *microspot* com óleo mineral preconizado originalmente (CROY et al., 2010) e também recomendado por Bizinotto e colaboradores (2014), mostrou-se inadequado devido à dificuldade em remover este óleo aderida na superfície dos meios de cultivo. Portanto, a análise das células uNK cultivadas em *microspot* aderidas ao substrato de fibronectina é um fator limitante devido aos procedimentos difíceis para avaliações subsequentes.

Embora a análise das células uNK em cultivo *microspot* seja passível em avaliações diretas ao microscópio enquanto permanecem com o seu formato esférico e aparentemente com

tênue aderência focal, são substancialmente diferentes da maioria das células de linhagens estabelecidas que tornam-se achatadas e proliferam firmemente aderidas no substrato do cultivo. Por outro lado, enquanto outros linfócitos obtidos do sangue circulante ou de órgãos linfóides (BØYUM, 1976; TIMONEN et al., 1982; CRELLIN; GARCIA; LEVINGS, 2007; FAUCE; YANG; EFFROS, 2007; LISSANDRELLO et al., 2018; WIEDE; TIGANIS, 2018), assim como, as células uNK de humanos (HANNA et al., 2003; ROBSON et al., 2012a) permanecem livres e flutuantes nos meios de cultivo, as células uNK isoladas do útero gestante sobrevivem maior tempo quando cultivadas sobre o substrato de fibronectina (CROY et al., 2010). Esta peculiaridade pode estar diretamente relacionada com o fato da proliferação, diferenciação e ativação das células uNK de camundongos ocorrerem exclusivamente no ambiente do útero gestante (CROY et al., 2003), em particular na região mesometrial onde a fibronectina está presente como componente da matriz extracelular (BABIARZ et al., 1996; ZAVAN et al., 2010, 2012). Corroboram ainda para esta hipótese a expressão de diversas integrinas tais como a $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\beta 7$ na membrana plasmática das células uNK, dentre os quais a $\alpha 5$ que tem como ligante a fibronectina (ZAVAN et al., 2010).

Por outro lado, dentre os diversos testes de cultivo a alternativa adotada em todos os nossos experimentos com o cultivo das células uNK em *microspot* sobre lâminas com áreas delimitadas por películas de máscaras epoxy e sem o recobrimento com o óleo mostrou-se eficiente e de fácil manipulação. Desde que tomadas todas as precauções de esterilidade dos instrumentos e assepsia nos procedimentos realizados dentro da câmara de fluxo laminar não houveram contaminações bacterianas ou de fungos nos intervalos de tempo analisados. Neste procedimento, as células isoladas dos sítios de implantação embrionária no 9ºdg de camundongos por meio do gradiente de Percoll e cultivadas sobre lâminas com máscara epoxy, na proporção de 3×10^4 células permitiram a manipulação do cultivo tanto para remoção e renovação, quanto para substituição dos meios de cultivo por meio de capilares de vidro acoplado a micromanipulador.

Os hormônios gonadotrófico coriônico e ovarianos afetam a diferenciação e viabilidade das células uNK *in vitro*

Os resultados dos nossos experimentos de cultivo de células uNK nos meios suplementados com os hormônios gonadotrófico coriônico (CG) e, progesterona (P) e estradiol

(E) ovarianos demonstram que as células uNK são sensíveis e responsivas a estes hormônios. Nos períodos iniciais de 48hs de cultivo as células uNK em meio suplementado com CG são maiores e apresentam citoplasma mais granuloso o que sugere a diferenciação destas células. De acordo com Paffaro e colaboradores (2003), os subtipos de células uNKDBA⁺ maiores e que apresentam maior granulosidade citoplasmática correspondem àquelas diferenciadas e presentes em áreas da região mesometrial próximas ao embrião em desenvolvimento, enquanto as células menores de citoplasma com poucos grânulos correspondem aos subtipos menos diferenciados e presentes no endométrio mesometrial próximo ao miométrio.

Estas células maiores e mais granulosas foram igualmente identificados nas culturas de 24-48h suplementadas com os hormônios ovarianos P e E em combinações como CG, porém não com o E isoladamente, pelo que se presume o hormônio E isoladamente não ter efeito sobre a diferenciação das uNK *in vitro*. As culturas suplementadas com P apresentam igualmente células uNK maiores e com citoplasma granuloso, sugerindo efeito semelhante entre P o CG. Embora as células uNK de humanos e murinos não expressem os receptores clássicos PR e ER α 1 para os hormônios esteroides (KING; GARDNER; LOKE, 1996; BORZYCHOWSKI et al., 2003; HENDERSON et al., 2003; OH; CROY, 2008), por outro lado expressam o receptor de glicocorticóides (GR) para progesterona (GUO et al., 2012) assim como, o receptor ER β 1 para estradiol (HENDERSON et al., 2003). Desta forma, presume-se a capacidade responsiva das células uNK também para os hormônios esteroides P e E.

Interessante observar que a superfície das células uNK em meio de cultivo suplementada com CG apresentam inúmeros brotamentos em forma de vesículas esféricas com conteúdo e granulosidade semelhantes ao do citoplasma destas células nas observações à fresco no microscópio de contraste de fase. Este fenômeno observado em cultivos de 24hs resultam em inúmeras vesículas esféricas de tamanhos variados sedimentadas ao lado das células uNK que acentua após 48h. Estas vesículas foram observadas em menor proporção nos cultivos suplementados com P e raramente com E. Porém, as combinações de P ou E com o CG apresentam proporções semelhantes destas vesículas observados com CG isolado. Pela análise ao microscópio eletrônico, estas vesículas apresentam-se envoltas pela membrana plasmática e internamente, um conteúdo semelhante ao do citoplasma das células uNK. Chama a atenção os diversos corpos eletrodensos compactos e delimitados, de dimensões variadas, muitas com arranjos que se assemelham a corpos mielínicos. Presume que estas estruturas sejam os grânulos lisossomo-secretor em degeneração. A fragmentação citoplasmática com liberação de vesículas envoltas por membrana plasmática é um processo fisiológico comum encontrado em

vários tipos celulares, como por exemplo: - nos megacariócitos que liberam as plaquetas (HEIJNEN et al., 1998); - os lipossomos da secreção láctea das glândulas mamárias (MCMANAMAN; NEVILLE, 2003) ou; - a fragmentação citoplasmática que precedem a morte celular por apoptose (ELMORE, 2007) . Este fenômeno da liberação de vesículas citoplasmáticas pelas células uNK *in vitro* sob a influência do CG é um relato inédito e merece investigações futuras sobre o significado fisiológico deste comportamento das células uNK na interface materno-fetal.

O presente estudo demonstra também de forma inédita que o CG promove a sobrevida de maior duração das células uNK viáveis em maior proporção que perdura até 192hs, se comparada com o limite da sobrevida de 120h das células uNK em cultivo padrão. As combinações com os hormônios estrogênicos ovarianos, demonstram ainda uma melhor relação de sobrevida nas combinações de CG com P e CG com P+E que perdura até 216h. Ao longo dos períodos de cultivo, observa-se uma redução gradual da proporção de células íntegras aderidas no substrato, pelo que se presume a não ocorrência da proliferação das células uNK nas condições de cultivo.

As células uNK sintetizam e secretam constitutivamente o VEGF (*vascular endothelial growth fator*) como pode ser observado tanto na fração celular quanto no sobrenadante dos cultivos controles em meio condicionado com IL-15. Porém, os nossos resultados demonstram uma redução na atividade de biossíntese e secreção do VEGF das células uNK sob o efeito do CG nas primeiras 24hs de cultivo. As células uNK tanto de humanos quanto de camundongos são consideradas uma das principais produtoras de fatores que regulam a angiogênese e neovascularização durante a gestação entre eles, a angiopoietina (Ang1), angiogenina (Ang2), fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LASH et al., 2005, 2006b; LASH; ROBSON; BULMER, 2010; ROBSON et al., 2012b). Este resultado contraditório de redução na atividade de biossíntese e secreção do VEGF sob o efeito do CG parece ser específica para as células uNK, uma vez que o CG tem sido relatado como importante regulador da angiogênese na interface materno fetal (CHOI; SMITZ, 2014), inclusive pelo efeito direto sobre as células endoteliais dos vasos uterinos (BOURDIEC et al., 2012, 2013). O efeito benéfico do CG através da ativação da angiogênese por meio de perfusão intra-uterina da CG aumenta significativamente o sucesso na taxa de gravidez bem sucedida quando realizada antes da transferência de embriões em mulheres com falhas recorrentes de implantação (HUANG et al., 2018). Estes dados demonstram que enquanto a CG atua positivamente na regulação da

angiogênese uterina, tal efeito não decorre da resposta direta das células uNK. Ou seja, a ativação da angiogênese via VEGF das células uNK na interface materno-fetal deve ser regulada por outros mecanismos, dentre os quais, a hipóxia local (MINCHENKO et al., 1994; KALKUNTE et al., 2008).

Da mesma forma, os hormônios P e E isoladamente não alteram a atividade de biossíntese (fração celular) e secreção (fração sobrenadante) do VEGF. Por outro lado, a baixa concentração do VEGF observada nos sobrenadantes destas culturas sugerem, com exceção da P isolada, que o VEGF não é secretado pelas células uNK *in vitro* sob o efeito combinado destes hormônios. Apesar do nível de concentração do VEGF ser maior sob o efeito do P isolado em relação tanto ao controle quanto aos demais hormônios e suas combinações, presume-se que no ambiente uterino ocorra sempre a ação conjunta parácrina e endócrina dos hormônios CG+P+E. Ou seja, de acordo com estes resultados tanto o CG quanto os hormônios estrogênicos ovarianos em suas combinações não influem positivamente na ativação da biossíntese e secreção do VEGF pelas células uNK de camundongos.

A ativação da via citotóxica na resposta imune inata das células uNK pode ser mediada pelo TNF- α , uma citocina pró-inflamatória da categoria Th1 (CASEY et al., 1989; CHAOUAT et al., 1990; OTUN et al., 2011). A constatação do TNF- α no sobrenadante do cultivo controle de células uNK confirmam a biossíntese e secreção constitutiva desta citocina pelas células uNK, como tem sido reportado em outros estudos (BAUER et al., 2004; RENAUD et al., 2005; HUBER et al., 2006; OTUN et al., 2011). Sob o efeito do CG, a concentração do TNF- α é similar ao do controle, porém verificam-se reduções sob o efeito dos hormônios P e E isoladamente. Embora as combinações de CG+E e CG+P apresentem aumento na concentração do TNF- α nos sobrenadantes de cultura, a combinação do conjunto dos hormônios CG+P+E apresenta redução na concentração do TNF- α se comparado ao controle. Ou seja, no útero gestante em que os três hormônios atuam simultaneamente, a expressão do TNF- α das células uNK seria regulada negativamente, sobretudo sob a modulação do CG. Estes resultados corroboram com os relatos de Zhang e colaboradores (2003), que sugerem a ação do CG como mediador que promove a redução da resposta imune pró-inflamatória de macrófagos, assim como em linfócitos T (LIN et al., 1995; SONG et al., 2000; RAO, 2001)

Cumprе salientar que o TNF- α não foi detectado na fração celular dos cultivos de células uNK pelo método empregado neste estudo. Este resultado (não apresentado) pode ser explicado pelo fato desta citocina não ser acumulada no interior das células, sendo sintetizada

e rapidamente secretada sob estímulos específicos, o que pode resultar em concentrações abaixo do limiar de sensibilidade do método utilizado. Por outro lado, seguramente o CG não ativa a biossíntese do TNF- α pelas células uNK *in vitro*.

Ao lado do TNF- α , o IFN- γ é outra citocina considerada constitutivamente secretada pelas células uNK (ASHKAR; DI SANTO; CROY, 2000; CROY et al., 2003, 2010; LASH et al., 2006a; WU et al., 2006). Pelo método utilizado em nosso estudo para análise do IFN- γ , esta citocina pró-inflamatória não foi detectada no sobrenadante ou nas células em cultivo sob a influência dos hormônios CG, P, E e suas combinações. Estes resultados negativos não significam que as células uNK *in vitro* não possam sintetizar e secretar esta citocina, sendo a causa provável o limiar de sensibilidade do método de análise adotado no presente estudo.

A ativação da via citolítica da resposta imune inata pelas células uNK pode ser mediada pelas proteínas líticas granzima e perforina acumuladas nos grânulos lisossomo-secretor (PARR et al., 1990; ZHENG; OJCIUS; YOUNG, 1993; CLARK; GRIFFITHS, 2003; LIMA et al., 2012; LIMA; PAFFARO; YAMADA, 2013) que induzem a morte por apoptose das células alvo. A detecção da granzima B tanto na fração celular quanto no sobrenadante dos cultivos das células uNK confirmam a biossíntese e secreção constitutiva desta proteína pelas células uNK de camundongos *in vitro*. Sob o efeito do CG ou, este em combinações com o P e/ou E constata-se a redução na fração celular, o que sugere tanto a supressão da biossíntese da granzima ou o não acúmulo deste conteúdo nos grânulos citoplasmáticos das células uNK *in vitro*. Enquanto P e E isoladamente apresentam redução das concentrações da granzima tanto nas frações celular quanto nos sobrenadantes das células uNK em cultivo, as combinações de P e E com o CG apresentam uma redução mais acentuada nos sobrenadantes granzima. Por outro lado, à semelhança do CG isolado, a combinação de CG+P+E resulta em concentrações de granzima no sobrenadante semelhantes ao do controle.

Estes dados acima sugerem que o CG pode promover tanto a regulação negativa na biossíntese da granzima quanto o não acúmulo desta proteína da via citolítica, e acelera a liberação do conteúdo da granzima para o compartimento extracelular no intervalo de 24hs. Saliente-se que a fração do sobrenadante contém também as vesículas citoplasmáticas produzidas pelas células uNK em cultivo. Estas vesículas que apresentam grânulos lisossomo-secretor em aparente degeneração podem conter as proteínas líticas. Isto é, a maior concentração de granzimas na fração do sobrenadante podem estar contidas nestas vesículas. Ou seja, as células uNK sob o efeito do CG aparentam suprimir a biossíntese da granzima e

aquelas já compartimentalizadas nos grânulos lisossomo-secretor, são segregados da célula via formação das vesículas citoplasmáticas que destacam da superfície celular. Esta segregação do conteúdo da granzima pode resultar na regulação negativa da ação lítica da resposta imune inata das células uNK sob o efeito do CG, como tem sido relatada a imunossupressão sob o efeito do CG em leucócitos isolados de outros órgãos (LIN et al., 1995; SONG et al., 2000; RAO, 2001; ZHANG; RAO; LEI, 2003)

A célula uNK sintetiza e secreta IL-10 que promove a modulação das células dendríticas (DC) no útero evitando a perda gestacional (BLOIS et al., 2017). A inoculação da citocina IL-10 por si só em camundongos gestante provoca abortos (BLOIS et al., 2017), portanto a modulação da expressão do IL-10 na interface materno-fetal é crítica para o sucesso da gravidez em camundongos. Em nosso resultado não foi possível detectar a expressão do IL-10 na fração celular ou no sobrenadante dos cultivos controle ou suplementada pelos hormônios, devido provavelmente ao baixo limiar de sensibilidade do método adotado para a análise desta citocina. Contudo, pela relevância da IL-10 na modulação da homeostasia da gestação, os estudos sobre os mecanismos que regulam a expressão desta citocina pelas células uNK merecem atenção em estudos futuros específicos.

Comportamento das células uNK *in vitro* desafiadas com LPS, líquido amniótico e embrioblastos.

As células uNK frente à adição do lipopolissacarídeo (LPS) no meio de cultivo suplementado com os hormônios CG+P+E não apresentam redução ou aumento visual na proporção de células viáveis após 24hs. Ou seja, o LPS aparentemente não promove a lise celular ou proliferação das células uNK *in vitro*.

Interessante observar que enquanto a secreção do TNF- α tende a reduzir sob o efeito do LPS, ocorre aumento na concentração da granzima na fração celular em relação ao controle, porém similares nos sobrenadantes demonstram que as células uNK são sensíveis à ação do LPS, promovendo a biossíntese com provável acúmulo dada granzima B armazenada nos seus grânulos lisossomo-secretor. Isto sugere a ativação da resposta das células uNK *in vitro* relacionada com a atividade citolítica da resposta imune inata. Murphy e colaboradores (2005), relatam o efeito abortivo do LPS quanto inoculado no útero gestante, mediado pela

citotoxicidade das células uNK de camundongos, porém os relatos de Van Der Meer e colaboradores (2004), demonstram a supressão das citocinas pró-inflamatórias tais como o $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ na resposta imune inata mediadas pelas células NK sob a influência do CG. Ou seja, agentes patogênicos como bactérias que apresentam LPS em suas paredes, podem ativar a via citolítica da resposta imune inata das células uNK mediado pelas proteínas líticas acumuladas nos seus grânulos lisossomo-secretor, sem contudo, ativar a via citotóxica mediado pelas citocinas pró-inflamatórias como o $\text{TNF-}\alpha$.

Semelhante ao que se observa com o LPS, as células uNK frente à adição do líquido amniótico apresentam maior concentração de granzima nas células se comparada com a do cultivo controle. Enquanto as concentrações de VEGF se equivalem entre controles e frente à adição do líquido amniótico, a concentração de $\text{TNF-}\alpha$ embora presente no controle, é indetectável sob o efeito do líquido amniótico. Estes resultados demonstram que a biossíntese e secreção do VEGF não sofre qualquer influência pela adição do líquido amniótico. Por outro lado, a biossíntese e secreção da granzima é regulada positivamente pelo líquido amniótico, sugerindo a ativação da via mediada por proteínas citolíticas na resposta imune inata das células uNK. A composição do líquido amniótico é complexa (BENZIE et al., 1974; RENFREE; HENSLEIGH; MCLAREN, 1975; FAUZA, 2004; DELO et al., 2006; GOMEZ-LOPEZ et al., 2018). O líquido amniótico que acumula na cavidade delimitada pela membrana amniótica é considerada primariamente como um meio líquido importante para manter o embrião e o feto “protegido” de impactos mecânicos, mas também é o meio onde o feto descarta os primeiros dejetos gerados pelo seu sistema urinário e digestivo (JANG; BRACE, 1992; FAUZA, 2004; DELO et al., 2006; GOMEZ-LOPEZ et al., 2018). Ou seja, pode conter diversos derivados do metabolismo e catabolismo das células embrionárias ao longo da gestação. Nos procedimentos clínicos de amniocentese e cirurgias fetais, são inevitáveis a ruptura da membrana amniótica e consequente extravasamento do líquido amniótico. Nestes procedimentos são tomadas as precauções de promover a sutura (colas cirúrgicas) dos locais da ruptura da membrana amniótica sob o risco de aumentar as perdas gestacionais ou induzir o parto prematuro (SERIN; ARIKAN, 2013; ACOG; COMMITTEE ON GENETICS; SOCIETY FOR MATERNAL-FETAL MEDICINE, 2016; KRASTIÑA et al., 2017). Porém, pouca atenção é voltada sobre as possíveis influências do conteúdo do líquido amniótico extravasado sobre as células e tecidos da interface materno-fetal, em particular sobre as células uNK que acumulam em grande quantidade nesta interface. Os mecanismos e a identificação do fator contido no líquido

amniótico que estimula a biossíntese da granzima, pelas células uNK merece atenção em estudos futuros.

As células uNK desafiadas em co-cultura com células embrioblásticas (E14Tg2A) em meio suplementado com os hormônios CG+P+E, demonstram menor desenvolvimento das células embrionárias agrupadas em ilhotas no período de 24h. Enquanto o cultivo de células embrioblásticas isoladas formam inúmeras ilhotas de células agregadas, fruto da proliferação e diferenciação de cada célula semeada no meio de cultivo, o co-cultivo com células uNK reduz visualmente a proporção destas ilhotas de células embrioblástica. A concentração da granzima aumenta nos co-cultivos se comparada com a da uNK isolada podendo estar relacionada com o menor desenvolvimento das células embrioblásticas. Presume-se que a semeadora na proporção de 1:1 de células uNK e células E14Tg2A, promove o contato de interação aleatória entre estas células e consequentemente nem todas as células E14Tg2A são acopladas às células uNK. Ou seja, as células E14Tg2A não acopladas com células uNK prosseguem na sua dinâmica de proliferação e diferenciação normal, enquanto aquelas acopladas com células uNK, sofrem a ação citolítica. Não se descarta ainda a possibilidade de uma ou mais células E14Tg2A que já iniciaram a sua proliferação serem acopladas tardiamente pelas células uNK, o que explica a ocorrência de ilhotas de células E14Tg2A de tamanhos variados em co-cultura com as células uNK. O fato de não ter sido detectado o TNF- α no sobrenadante das co-culturas sugere pouca ou nenhuma influência da presença das células embrioblásticas na ativação da biossíntese e secreção desta citocina pró-inflamatória pelas células uNK *in vitro*. Estes dados corroboram com a hipótese do mecanismo básico da ação citolítica da resposta imune inata das células uNK seja também mediada pelo reconhecimento mútuo entre a célula imunoefetora e célula alvo via ligantes e receptores de membrana específicos com formação da sinapse imunológica (DAVIS; DUSTIN, 2004; ORANGE, 2008; MACE et al., 2014). Nestas fendas da sinapse imunológica são liberados os mediadores citolíticos (perforina e granzimas) contidos nos grânulos lisossomo-secretor das células uNK.

6. CONCLUSÃO

Pelos resultados do presente estudo pode se concluir que:

1- As células uNK de camundongos expressam o receptor LH/CGr e são responsivas ao hormônio CG.

2- As células uNK de camundongos isoladas através do gradiente de percoll apresentaram maior rendimento de células viáveis não restritas ao fenótipo uNKDBA+.

3- A suplementação do hormônio CG (humano) isoladamente ou em combinações com os hormônios estrogênicos progesterona e estradiol no meio de cultivo, promove a diferenciação e maior proporção de células uNK viáveis que perduram por um período de tempo mais longo *in vitro*.

4- A suplementação do hormônio CG isoladamente ou em combinações com P e E, promovem modulação negativa na biossíntese e secreção de mediadores citotóxico/citolíticos como o TNF- α e a granzima B pelas células uNK *in vitro*, o que conota supressão da sua resposta imune inata sob a influência do CG e dos hormônios estrogênicos.

5- A suplementação do hormônio CG promove modulação negativa na biossíntese e secreção do VEGF pelas células uNK *in vitro*, o que conota a ocorrência de outros mecanismos para o estímulo da atividade angiogênica atribuída às células uNK no útero gestante.

6- Da mesma forma, as células uNK em cultivo com o meio suplementados com os hormônios CG+P+E respondem *in vitro* à presença tanto do líquido amniótico, quanto das células embrioblásticas pluripotentes por meio da ativação da biossíntese e secreção da proteína lítica granzima compartimentalizada nos grânulos lisosomo-secretor, que é característico da resposta imune inata.

7. ILUSTRAÇÕES

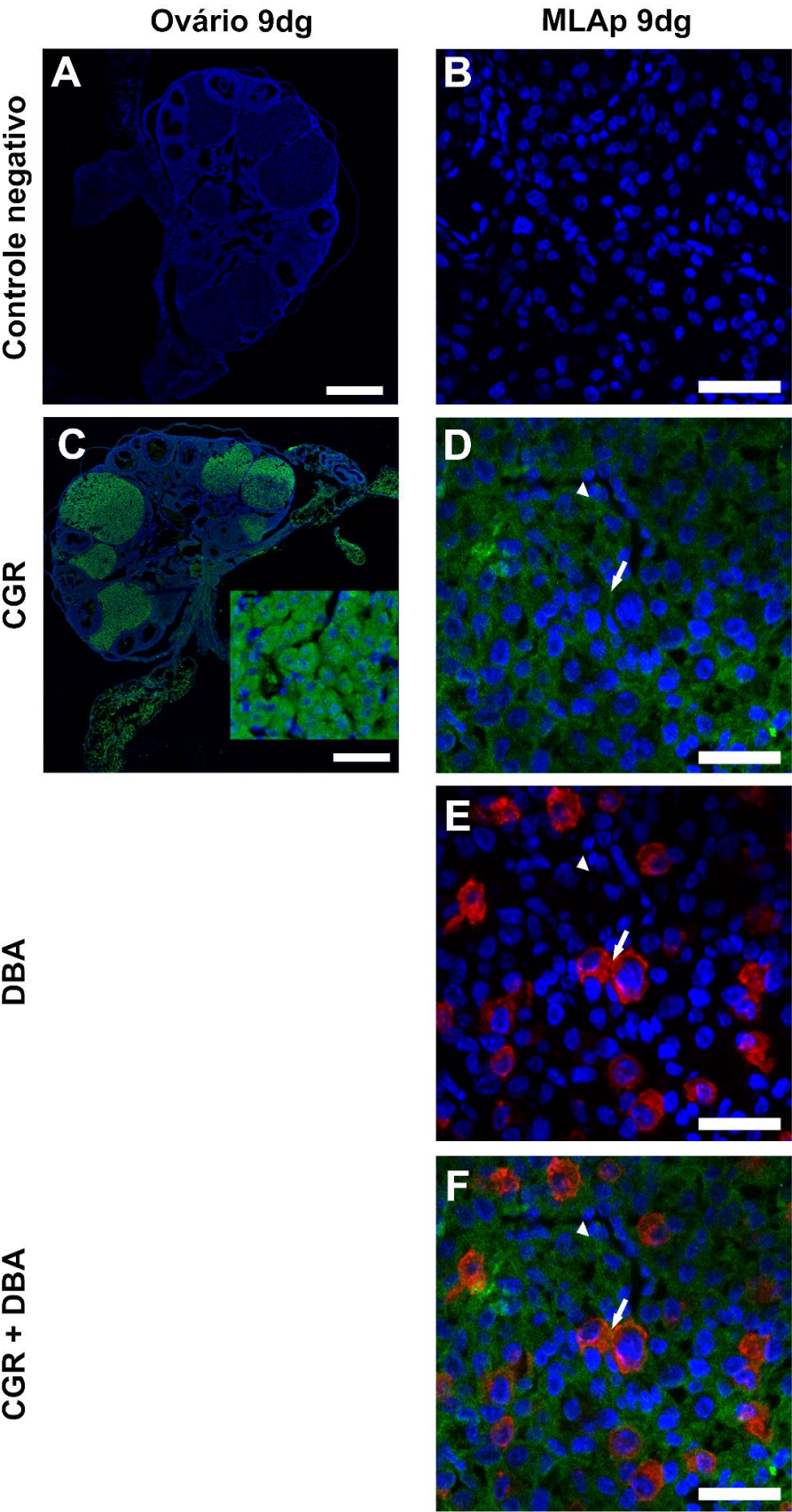


Figura 1. Reação imunocitoquímica de LH/CGR e citoquímica de lectina DBA. (A, B) –Controle da reação de imunocitoquímica de LH/CGR em ovário e da região mesometrial do útero gestante de camundongo no 9ºdg, respectivamente; (C) - reação positiva para LH/CGR em células do corpo lúteo em ovário demonstrando a especificidade do anticorpo anti-CGR; (D) – reação positiva de LH/CGR em células uNK e células decíduais da região do MLAp; (E) - Reação DBA⁺ das células uNK na região mesometrial; (F) – Reação positiva para LH/CGR em células uNKDBA⁺ na região do MLAp. Setas brancas: células uNK. Ponta da seta: células decíduais da região do MLAp. Barras: A-C=500µm, B,D,E,F= 30µm.

Morfologia das células

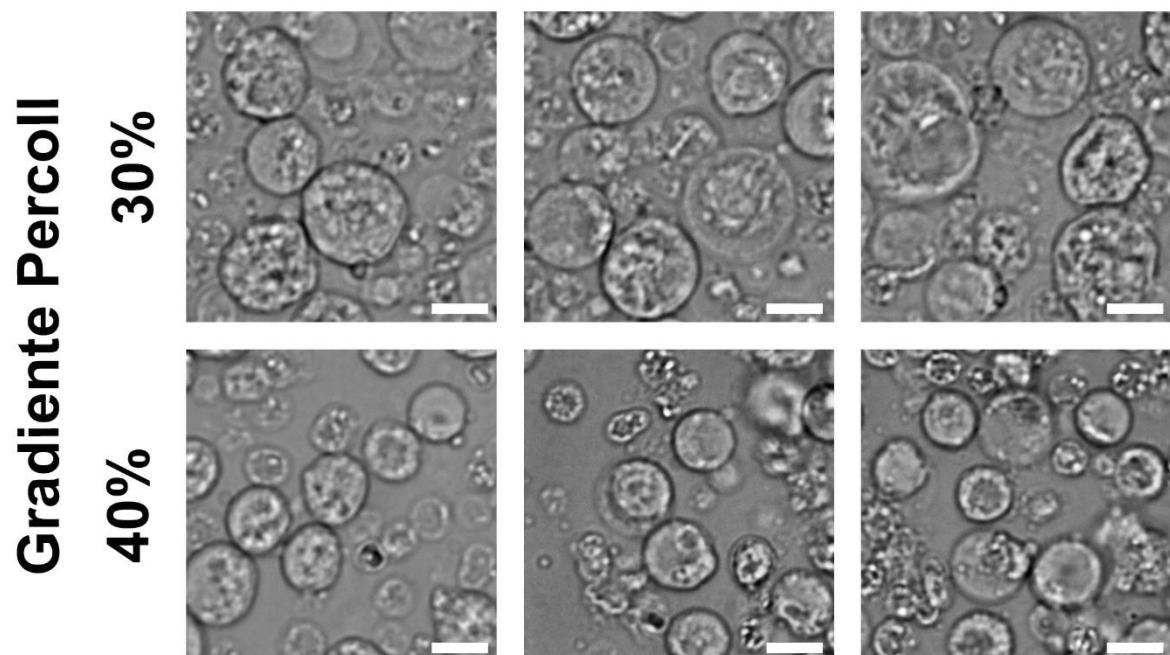


Figura 2. Fotomicrografia das células a fresco isoladas em gradientes de densidade de Percoll 30 e 40%. No gradiente de 30% predominam células maiores com citoplasma granuloso, enquanto na de 40% as células são menores e com citoplasma finamente granuloso. Barras: 10 μ m.

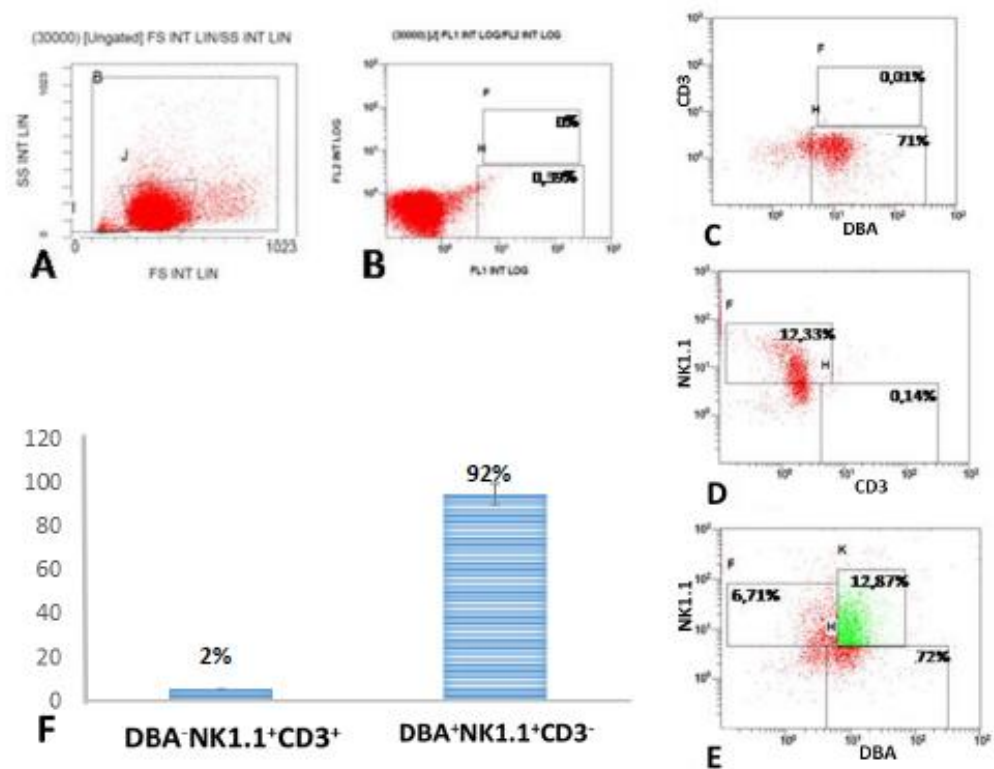
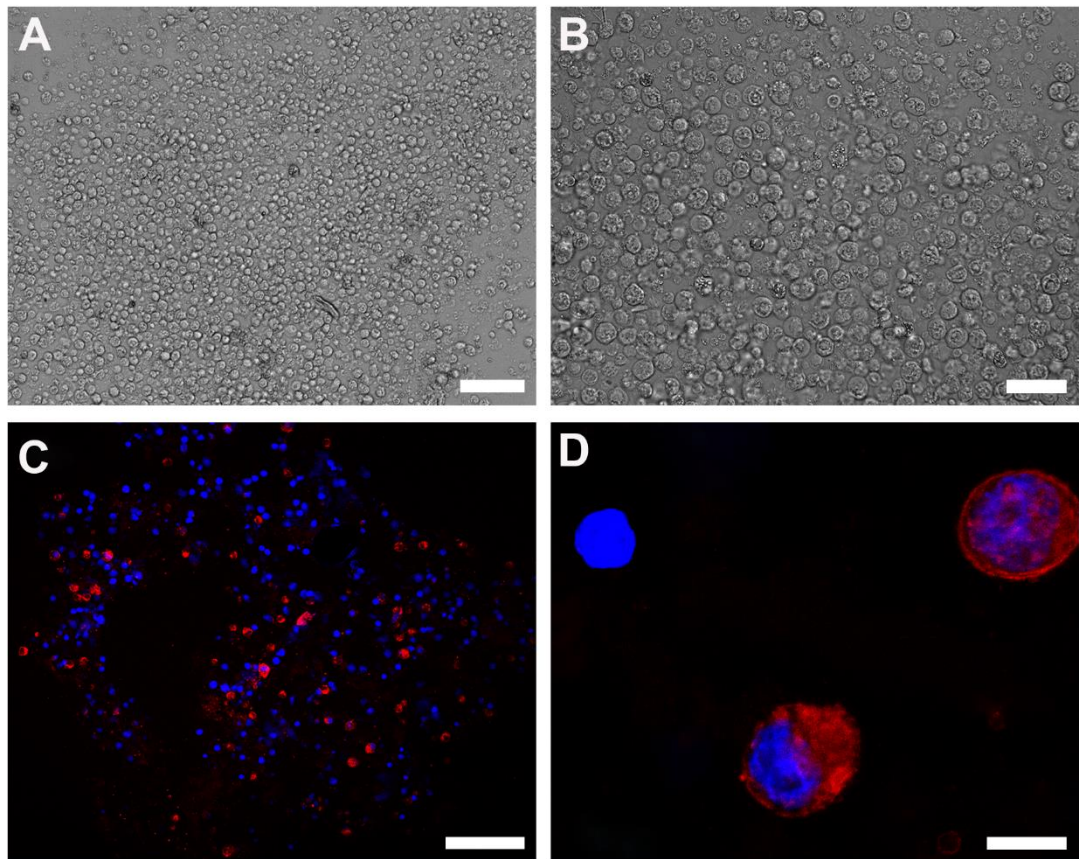


Figura 3 A-F. Citometria de fluxo das células uNK isoladas e agrupadas dos gradientes de Percoll (30 e 40%) marcadas pela lectina DBA, anti-CD3 e anti-NK1.1. (A,B) – *Dotplot* com gateR1 das células DBA⁺ isoladas nos gradientes de densidade por FSC x SSC. (C) – *Dotplot* das células DBA⁺ e CD3⁺; (D) – *Dotplot* das células NK1.1⁺ e CD3⁺; (E) – *Dotplot* de células DBA⁺ e NK1.1⁺; (F) –Histograma da proporção de células uNK DBA⁺NK1.1⁺ (92%) isoladas no gradiente de Percoll de 30 e 40%.



Figuras 4 A-D. Fotomicrografias de células isoladas da região do MLAp de sítios uterinos de desenvolvimento embrionário de camundongos no 9ºdg. (A,B) – Células isoladas pelo gradiente de Percoll observadas ao microscópio de contraste de fase cultivadas em *microspot* sem recobrimento com óleo mineral após 24 e 48 horas respectivamente; (C,D) – Reação citoquímica de lectina DBA realizada sobre lâmina com máscara epoxy tratada com fibronectina após 24 horas de cultivo de células isoladas pelo gradiente de percoll e cultivadas em *microspot* sem óleo mineral com adição de plasma sanguíneo. Barras: A,C= 100µm; B= 50µm; D= 10µm.

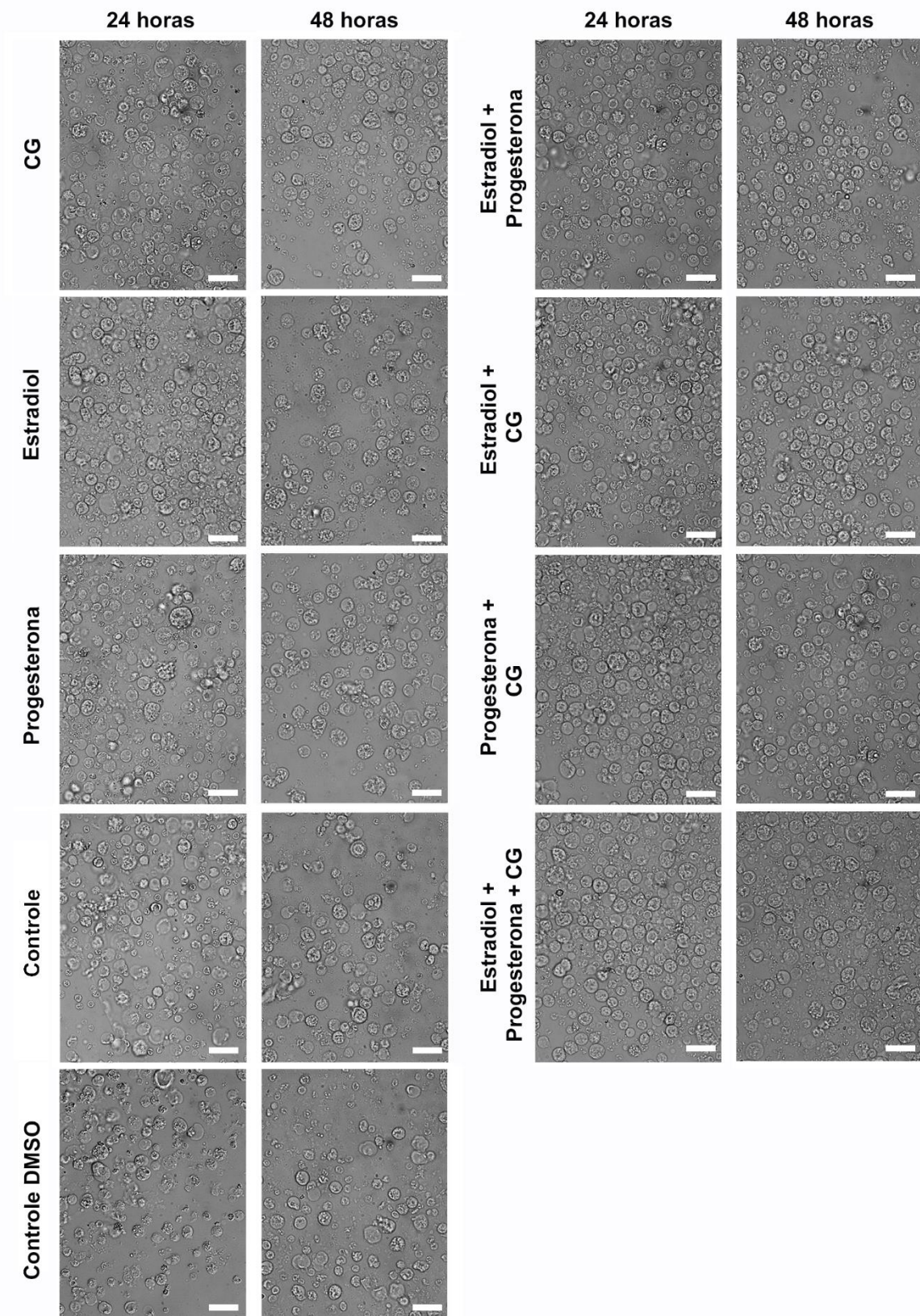


Figura 5. Fotomicrografias de células uNK isoladas em gradiente de percoll 30 e 40% cultivadas em meio condicionado com suplementação dos hormônios estradiol (E), progesterona (P) e gonadotrofina coriônica (CG) isolados e em combinações destes, nos períodos de 24 e 48h. Barras: 20µm.

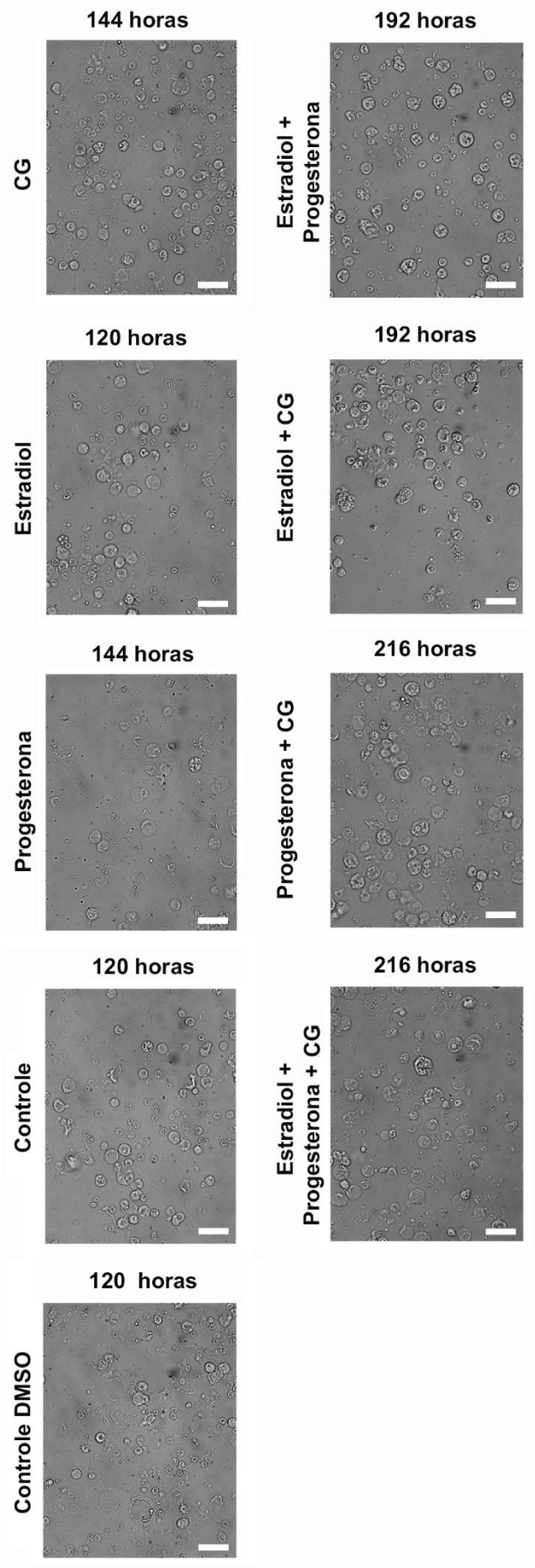


Figura 6. Fotomicrografias representativas do último período de cultivo de células uNK em meio condicionado com suplementação dos hormônios estradiol (E), progesterona (P) e gonadotrofina coriônica (CG) isolados e em combinações destes. Note as diferenças do período em horas de cada tratamento hormonal *in vitro* onde foram passíveis de encontrar células íntegras aderidas à superfície revestida com fibronectina. Barras: 20µm.

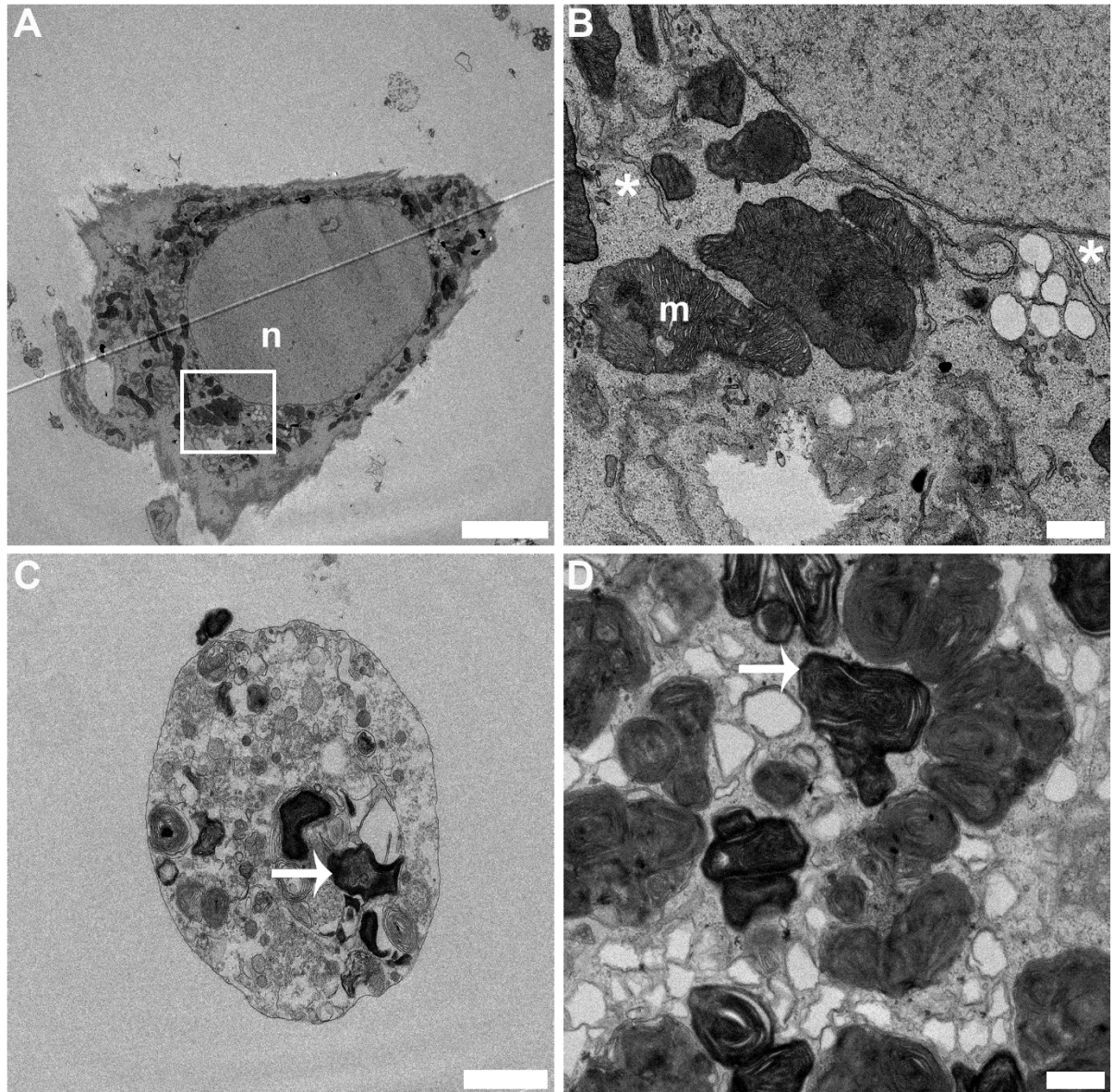


Figura 7. Micrografias eletrônicas de células uNK em cultivo *microspot* de 24h com meio suplementado pelo hormônio gonadotrofina coriônica. (A) Célula uNK aderida na superfície de fibronectina em câmara de cultivo, com núcleo (n) de cromatina frouxa, citoplasma escasso com as organelas concentradas na região peri-nuclear e; - em (B) detalhe de uma área da mesma célula apresentando cisternas do retículo endoplasmático granular (asteriscos) e mitocôndrias (m) típicas com membrana interna em projeções digitiformes. (C e D) – vesículas destacadas presentes no sobrenadante dos cultivos de células uNK, delimitada por membrana plasmática, preenchido por porções do citoplasma contendo organelas. Notar as estruturas eletrondensas correspondente aos grânulos que apresentam conteúdo em arranjo mielínico (setas brancas). Barras: A= 5 μ m, B,D= 500nm, C= 1 μ m.

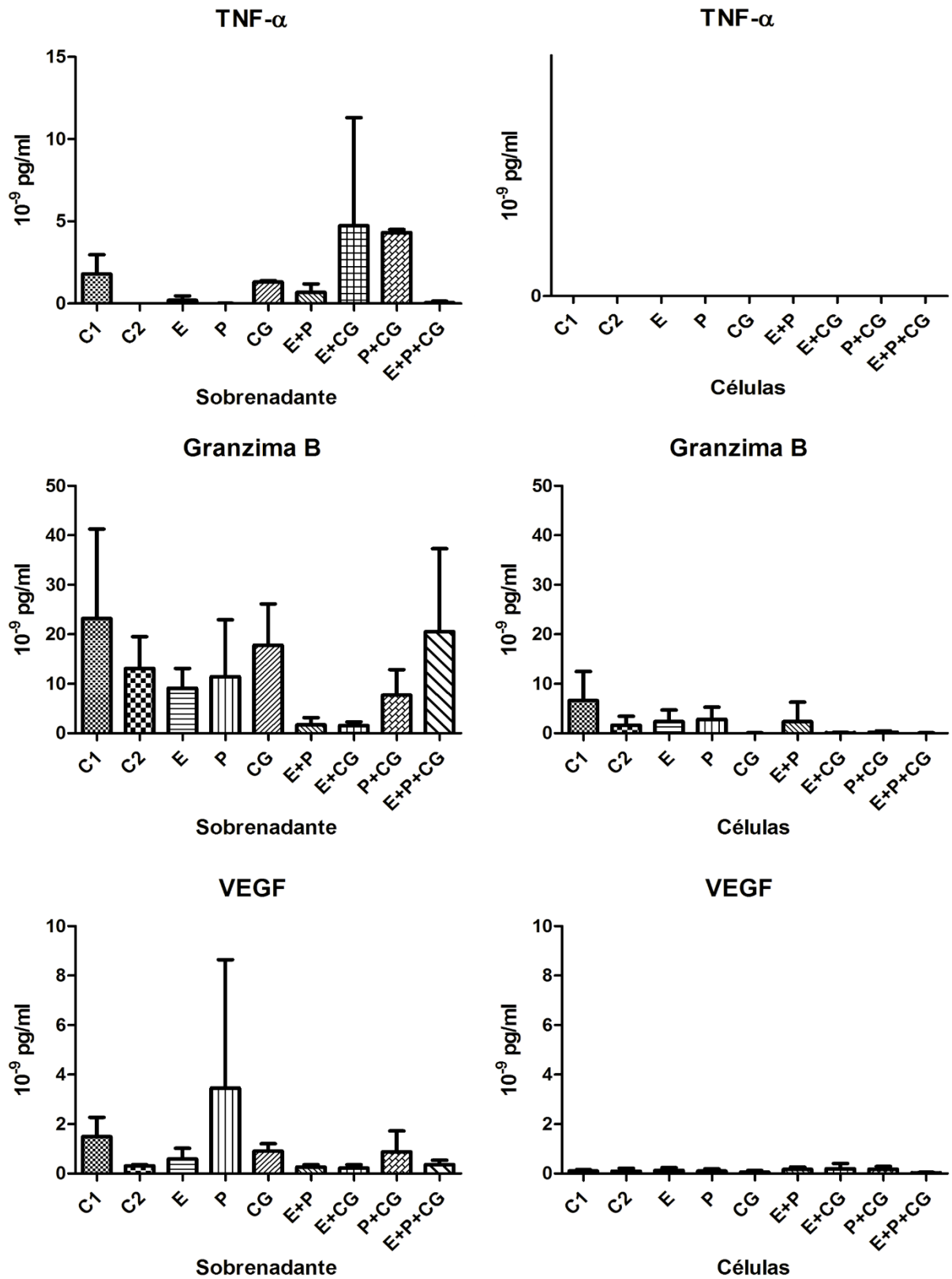


Figura 8. Histogramas das concentrações das proteínas TNF- α , Granzima B e VEGF detectadas nos sobrenadantes e das células uNK cultivadas em meios suplementados com os hormônios gonadotrofina coriônica (CG), progesterona (P) e estradiol (E).

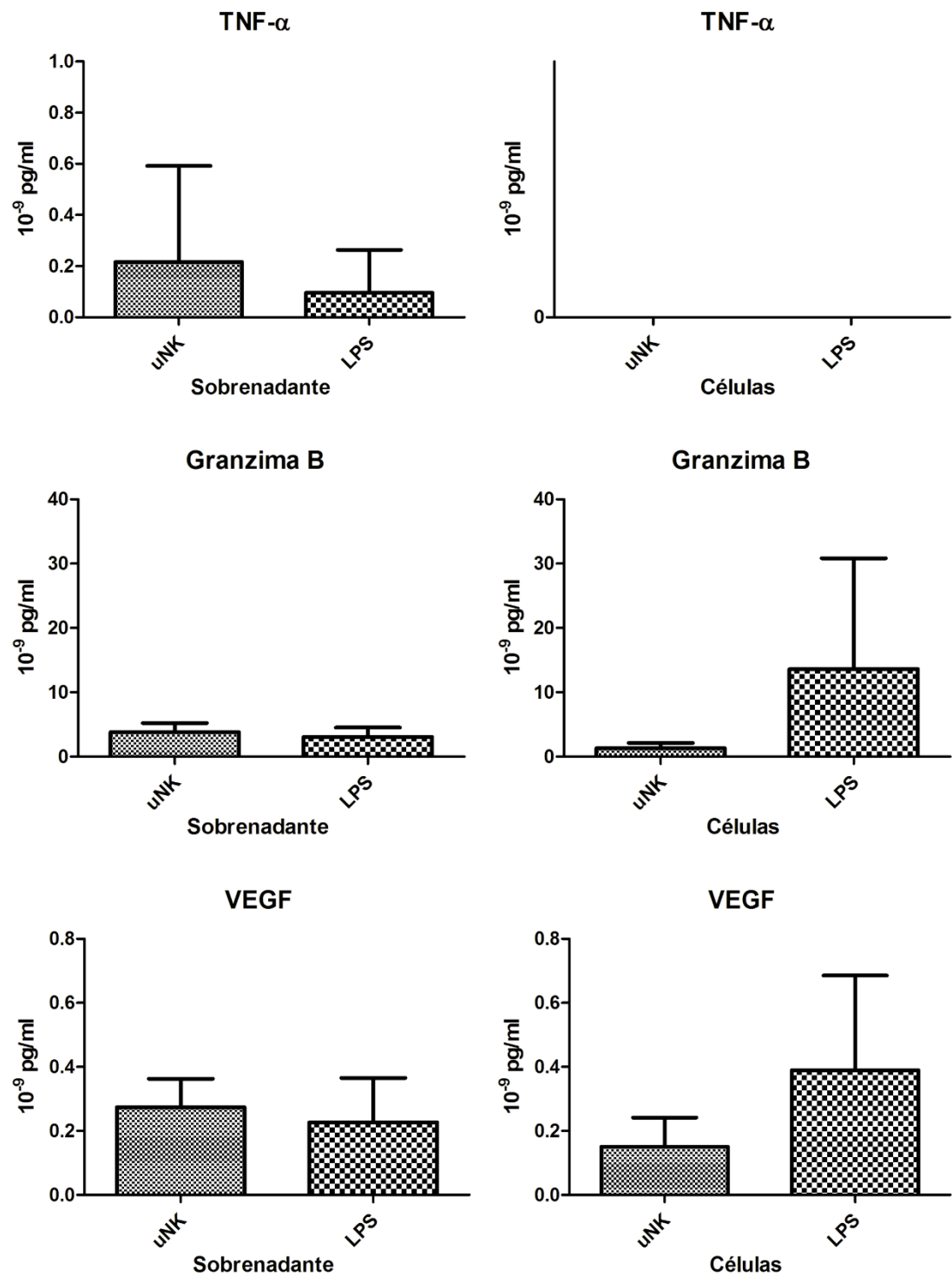


Figura 9. Histogramas das concentrações das proteínas TNF- α , Granzima B e VEGF detectadas nos sobrenadantes e nas células uNK cultivadas na presença do lipopolissacarídeo (LPS).

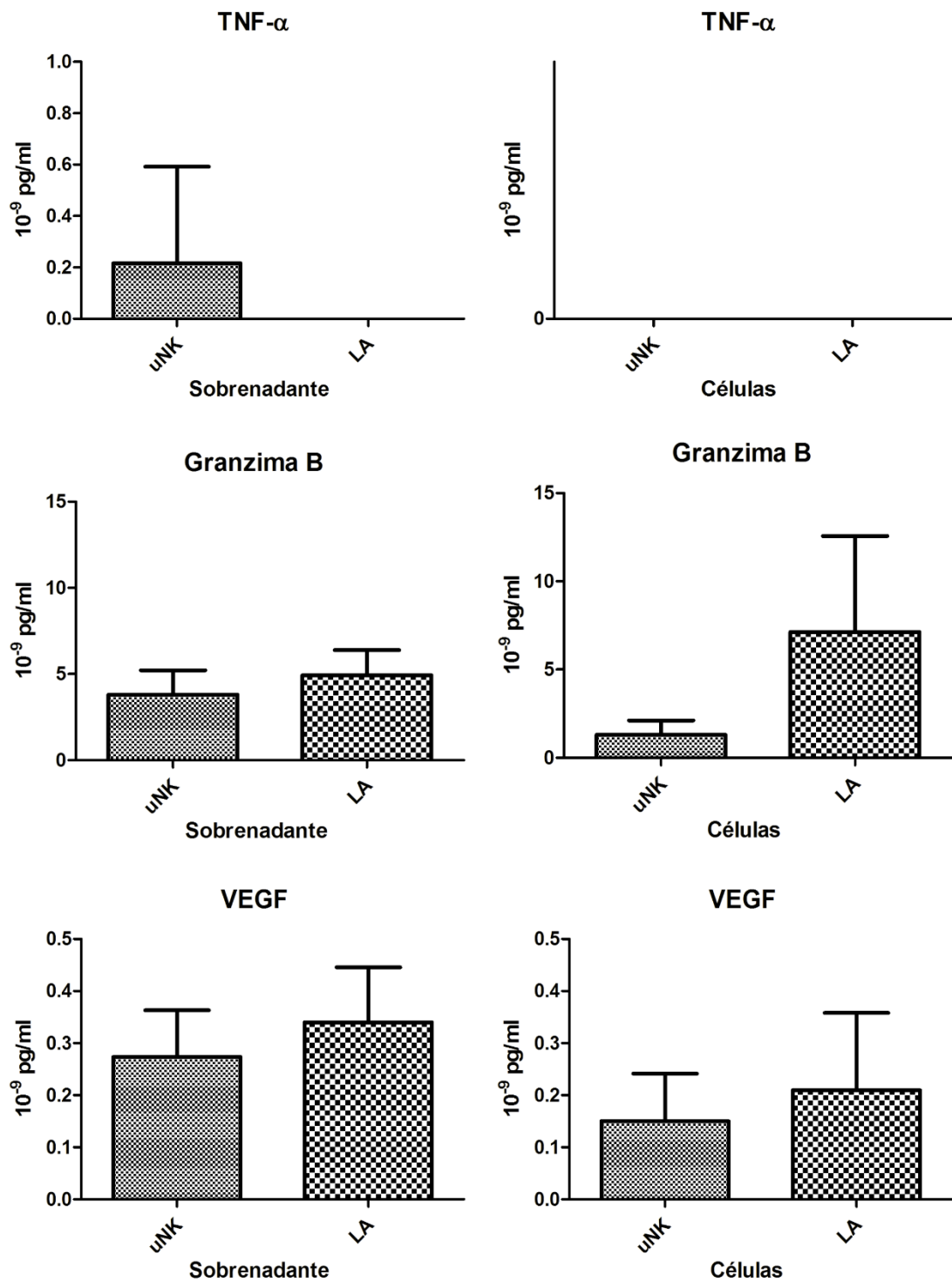


Figura 10. Histogramas das concentrações das proteínas TNF- α , Granzima B e VEGF detectadas no sobrenadante e nas células uNK cultivadas na presença do líquido amniótico.

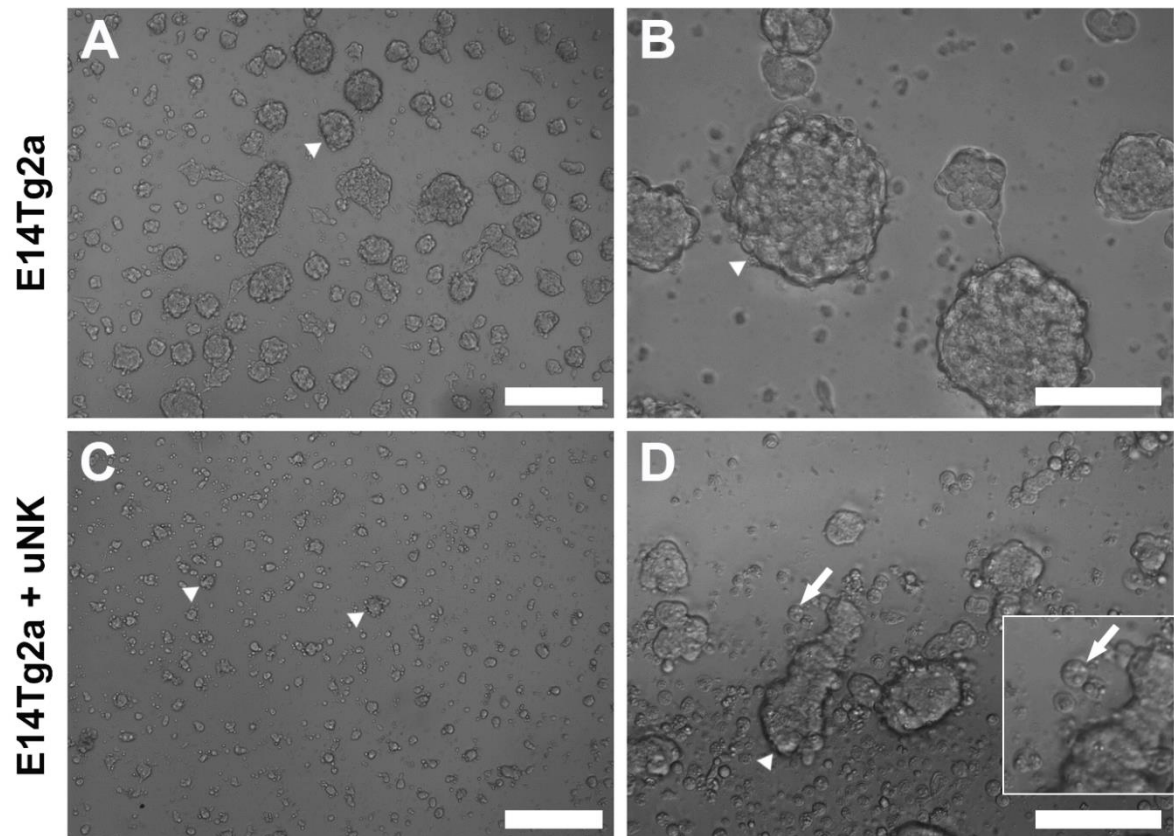


Figura 11. Fotomicrografias em microscopia de contraste de fase da co-cultura de células uNK e células embrionárias E14Tg2A. (A,B) – Controle de células E14Tg2A em meio DMEM suplementadas com os hormônios estradiol, progesterona e CG onde as células E14Tg2A formam colônias (setas); (C,D) – Co-cultura de células uNK e células E14Tg2A em meio DMEM suplementadas com os hormônios estradiol, progesterona e gonadotrofina coriônica (CG). Note a redução do número e tamanho das colônias de E14Tg2A (cabeças de seta) em co-cultura com células uNK (setas) que são identificadas próximas ou aderidas a uma colônia de E14Tg2A. Barras: A,C = 300 μ m, B,D=100 μ m.

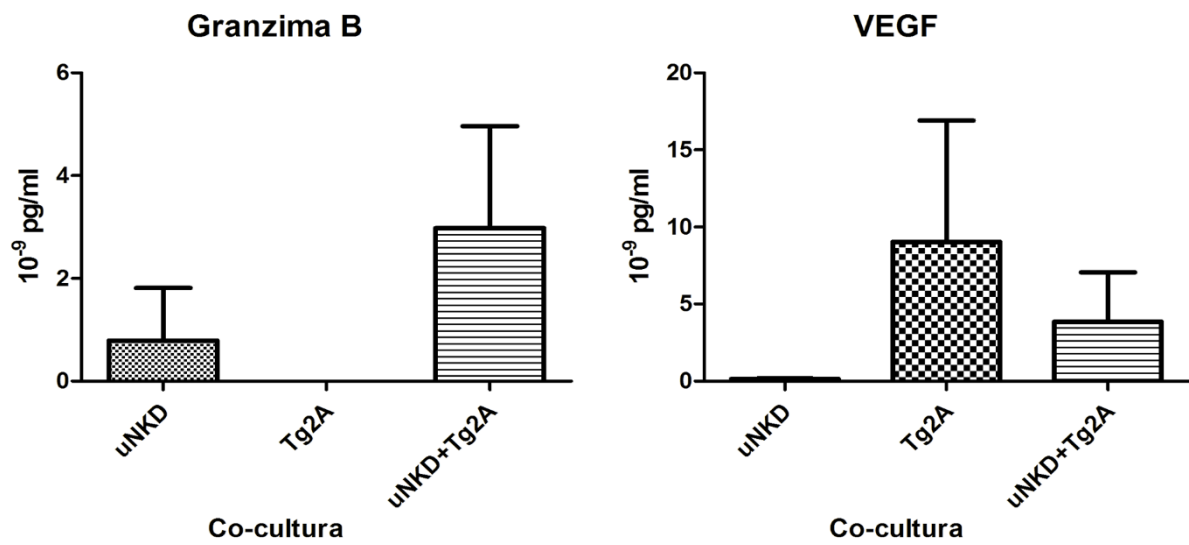


Figura 12. Dosagem das proteínas Granzima B e VEGF no ensaio de citotoxicidade em co-cultura com células E14Tg2A. uNKD – células uNK cultivadas em meio Dmem; Tg2A – células E14Tg2A.

8.REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T. Implantation and decidualization in rodents.

Journal of Experimental Zoology, v. 266, n. 6, p. 603–628, 1993.

ACOG, A. C. of O. and G. C. on P. B.; COMMITTEE ON GENETICS; SOCIETY FOR MATERNAL–FETAL MEDICINE. Practice Bulletin No. 162: Prenatal Diagnostic Testing for Genetic Disorders.

Obstetrics and gynecology, v. 127, n. 5, p. e108-22, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26938573>>.

ASHKAR, A. A.; BLACK, G. P.; WEI, Q.; HE, H.; LIANG, L.; HEAD, J. R.; CROY, B. A.

Assessment of Requirements for IL-15 and IFN Regulatory Factors in Uterine NK Cell

Differentiation and Function During Pregnancy. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 6, p. 2937–2944, 15 set. 2003. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.6.2937>>.

ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 2, p.

259–70, 17 jul. 2000. Disponível em:

<<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.192.2.259>>.

BABIARZ, B.; ROMAGNANO, L.; AFONSO, S.; KURILA, G. Localization and expression of fibronectin during mouse decidualization in vitro: mechanisms of cell:matrix interactions.

Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, v. 206, n. 3, p. 330–42, jul. 1996. Disponível em:

<[http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-](http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0177%28199607%29206%3A3%3C330%3A%3AAID-AJA10%3E3.0.CO%3B2-3)

[0177%28199607%29206%3A3%3C330%3A%3AAID-AJA10%3E3.0.CO%3B2-3](http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0177%28199607%29206%3A3%3C330%3A%3AAID-AJA10%3E3.0.CO%3B2-3)>.

BAHL, O. P.; CARLSEN, R. B.; BELLISARIO, R.; SWAMINATHAN, N. Human chorionic gonadotropin: amino acid sequence of the alpha and beta subunits. **Biochemical and**

biophysical research communications, v. 48, n. 2, p. 416–22, 25 jul. 1972. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5065067>>.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p.

361–371, 3 maio 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2628>>.

BARRIENTOS, G.; TIRADO-GONZÁLEZ, I.; KLAPP, B. F.; KARIMI, K.; ARCK, P. C.; GARCIA, M. G.; BLOIS, S. M. The impact of dendritic cells on angiogenic responses at the fetal-maternal interface. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1–2, p. 85–94, 2009.

BAUER, S.; POLLHEIMER, J.; HARTMANN, J.; HUSSLEIN, P.; APLIN, J. D.; KNÖFLER, M. Tumor necrosis factor- α inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 2, p. 812–22, fev. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2003-031351>>.

BELLISARIO, R.; CARLSEN, R. B.; BAHL, O. P. Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the alpha subunit. **The Journal of biological chemistry**, v. 248, n. 19, p. 6796–809, 10 out. 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4745444>>.

BENZIE, R. J.; DORAN, T. A.; HARKINS, J. L.; OWEN, V. M.; PORTER, C. J. Composition of the amniotic fluid and maternal serum in pregnancy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 119, n. 6, p. 798–810, 15 jul. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4841182>>.

BIANCO, J.; STEPHENSON, K.; YAMADA, A. T.; CROY, B. A. Time-Course Analyses Addressing the Acquisition of DBA Lectin Reactivity in Mouse Lymphoid Organs and Uterus During the First Week of Pregnancy. **Placenta**, v. 29, n. 12, p. 1009–1015, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2008.09.007>>.

BIRON, C. A.; NGUYEN, K. B.; PIEN, G. C.; COUSENS, L. P.; SALAZAR-MATHER, T. P. NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines. **Annual Review of Immunology**, v. 17, n. 1, p. 189–220, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.17.1.189>>.

BIZINOTTO, M. C.; FELKER, A. M.; DEGAKI, K. Y.; YAMADA, A. T. Uterine Leukocyte Isolation and Culture. In: ELSEVIER (Ed.). **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. San Diego: Elsevier, 2014. p. 629–635.

BIZINOTTO, M. C.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; GABRIEL, D. L.; YAMADA, A. T. Uterine natural killer cells are immunogenic in syngeneic male mice. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 1, p. 18–25, out. 2008. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165037808000715>>.

BLOIS, S. M.; FREITAG, N.; TIRADO-GONZÁLEZ, I.; CHENG, S.-B.; HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; ROSE, M.; CONRAD, M. L.; BARRIENTOS, G.; SHARMA, S. NK cell-derived IL-10 is critical for DC-NK cell dialogue at the maternal-fetal interface.

Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 2189, 19 maio 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28526846>>.

BLOIS, S. M.; KLAPP, B. F.; BARRIENTOS, G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: Unravelling the functions of DC and NK cells. **Journal of Reproductive**

Immunology, v. 88, n. 2, p. 86–92, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2010.11.002>>.

BOGDAN, A.; BERTA, G.; SZEKERES-BARTHO, J. PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 119, p. 38–43, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2016.12.001>>.

BONNAMY, P. J.; BENHAÏM, A.; LEYMARIE, P. Estrous cycle-related changes of high affinity luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin binding sites in the rat uterus.

Endocrinology, v. 126, n. 2, p. 1264–9, fev. 1990. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2105203>>.

BONNAMY, P. J.; BENHAÏM, A.; LEYMARIE, P. Uterine luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-binding sites in the early pregnant rat uterus: evidence for total occupancy in the periimplantation period. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1240–6, mar. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440185>>.

BORZYCHOWSKI, A. M.; CHANTAKRU, S.; MINHAS, K.; PAFFARO, V. A.; YAMADA, A. T.; HE, H.; KORACH, K. S.; CROY, B. A. Functional analysis of murine uterine natural killer cells genetically devoid of oestrogen receptors. **Placenta**, v. 24, n. 4, p. 403–11, abr. 2003. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400402909240>>.

BOURDIEC, A.; CALVO, E.; RAO, C. V.; AKOUM, A. Transcriptome analysis reveals new insights into the modulation of endometrial stromal cell receptive phenotype by embryo-derived signals interleukin-1 and human chorionic gonadotropin: possible involvement in early embryo implantation. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64829, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717664>>.

BOURDIEC, A.; SHAO, R.; RAO, C. V.; AKOUM, A. Human chorionic gonadotropin triggers angiogenesis via the modulation of endometrial stromal cell responsiveness to interleukin 1: a new possible mechanism underlying embryo implantation. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 3, p. 66, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811570>>.

BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian journal of immunology**, v. Suppl 5, p. 9–15, jun. 1976. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.1976.tb03851.x>>.

BULMER, J. N.; JOHNSON, P. M. Immunohistological characterization of the decidual leucocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. **Immunology**, v. 55, n. 1, p. 35–44, 1985.

BURKHARDT, J. K.; HESTER, S.; LAPHAM, C. K.; ARGON, Y. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. **The Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 6, p. 2327–2340, 1 dez. 1990. Disponível em: <<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.111.6.2327>>.

CARSON, B. W. E.; GIRI, J. G.; LINDEMANN, M. J.; LINETT, M. L.; AHDIEH, M.; PAXTON, R.; ANDERSON, D.; EISENMANN, J.; GRABSTEIN, K.; CALIGIURI, M. a. From the "Departments of Medicine, Surgery, and Molecular Medicine, Roswell Park Cancer Institute, Buffalg New York 14263; and *Immunex Research and Development Corporation, Seattle, Washington 98101. **October**, v. 180, n. October, 1994.

CASEY, M. L.; COX, S. M.; BEUTLER, B.; MILEWICH, L.; MACDONALD, P. C. Cachectin/tumor necrosis factor-alpha formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. **The Journal of clinical investigation**, v. 83, n. 2, p. 430–6, 1 fev. 1989. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/113901>>.

CHAOUAT, G.; MENU, E.; CLARK, D. A.; DY, M.; MINKOWSKI, M.; WEGMANN, T. G. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. **Journal of reproduction and fertility**, v. 89, n. 2, p. 447–58, jul. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2119428>>.

CHOI, J.; SMITZ, J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: distinguishing unique physiologic roles. **Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, v. 30, n. 3, p. 174–81, mar. 2014.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283620>>.

CLARK, R.; GRIFFITHS, G. M. Lytic granules, secretory lysosomes and disease. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 5, p. 516–21, out. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791503001134>>.

COLUCCI, F.; CALIGIURI, M. A.; DI SANTO, J. P. What does it take to make a natural killer? **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 5, p. 413–425, 2003.

COLUCCI, F.; KIECKBUSCH, J. Maternal uterine natural killer cells nurture fetal growth: in medio stat virtus. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 2, p. 60–67, fev. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491414002263>>.

CRELLIN, N. K.; GARCIA, R. V.; LEVINGS, M. K. Flow cytometry-based methods for studying signaling in human CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells. **Journal of immunological methods**, v. 324, n. 1–2, p. 92–104, 31 jul. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175907001573>>.

CROY, A.; YAMADA, A. T.; DEMAYO, F. J.; ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Boston: Academic P, 2014.

CROY, B. A.; HE, H.; ESADEG, S.; WEI, Q.; MCCARTNEY, D.; ZHANG, J.; BORZYCHOWSKI, A.; ASHKAR, A. A.; BLACK, G. P.; EVANS, S. S.; CHANTAKRU, S.; VAN DEN HEUVEL, M.; PAFFARO, V. A.; YAMADA, A. T. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 126, n. 2, p. 149–60, ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887272>>.

CROY, B. A.; ZHANG, J.; TAYADE, C.; COLUCCI, F.; YADI, H.; YAMADA, A. T. Analysis of Uterine Natural Killer Cells in Mice. In: [s.l.: s.n.]p. 465–503.

D. A. LIMA, P.; A. PAFFARO, V.; T. YAMADA, A. (ed.). Part F: Functional Duality of Mouse Uterine Natural Killer Cell in Pregnancy. In: **Immunology of Pregnancy 2013**. [s.l.] BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2013. p. 335–359.

DAVIS, D. M.; DUSTIN, M. L. What is the importance of the immunological synapse? **Trends in immunology**, v. 25, n. 6, p. 323–7, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15145322>>.

DAVISON, B. B.; KAACK, M. B.; ROGERS, L. B.; RASMUSSEN, K. K.; RASMUSSEN,

T. A.; HENSON, E. W.; HENSON, M. C.; PAREKH, F. K.; KROGSTAD, D. J. The Role of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor Types I and II and Tumor Necrosis Factor- α in Malaria during Pregnancy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 1, p. 123–132, jul. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/504694>>.

DE MARIA, A.; BOZZANO, F.; CANTONI, C.; MORETTA, L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN- on activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 728–732, 11 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1012356108>>.

DELO, D. M.; DE COPPI, P.; BARTSCH, G.; ATALA, A. Amniotic fluid and placental stem cells. **Methods in enzymology**, v. 419, n. 6, p. 426–38, dez. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152169340400121X>>.

DOSIOU, C.; GIUDICE, L. C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: Endocrine and immunologic perspectives. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 1, p. 44–62, 2005.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>>.

FAAS, M. M.; DE VOS, P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. **Placenta**, v. 56, p. 44–52, ago. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400417301790>>.

FARIAS, A. M. **Análises dos efeitos da matriz extracelular, citocinas e quimiocinas na manutenção in vitro das células Natura Killers-Uterinas isoladas de camundongos. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Ca, 2007. .**

FAUCE, S. R.; YANG, O. O.; EFFROS, R. B. Autologous CD4/CD8 co-culture assay: a physiologically-relevant composite measure of CD8+ T lymphocyte function in HIV-infected persons. **Journal of immunological methods**, v. 327, n. 1–2, p. 75–81, 31 out. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175907002281>>.

FAURIAT, C.; LONG, E. O.; LJUNGGREN, H.-G.; BRYCESON, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. **Blood**, v. 115, n. 11, p. 2167–2176, 18 mar. 2010. Disponível em:

<<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-08-238469>>.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 877–91, dez. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582544>>.

FRIES, R. U. De; GOLUB, S. H. Characteristics and mechanism of IFN-gamma-induced protection of human tumor cells from lysis by lymphokine-activated killer cells . • Rapid Reviews ! 30 days * from submission to initial decision Information about subscribing to The Journal of Immunology. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 10, p. 3686–3693, 1988.

FUKUI, A.; KAMOI, M.; FUNAMIZU, A.; FUCHINOUE, K.; CHIBA, H.; YOKOTA, M.; FUKUHARA, R.; MIZUNUMA, H. NK cell abnormality and its treatment in women with reproductive failures such as recurrent pregnancy loss, implantation failures, preeclampsia, and pelvic endometriosis. **Reproductive medicine and biology**, v. 14, n. 4, p. 151–157, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29259412>>.

GAILLY-FABRE, E.; KERLAN, V.; CHRISTIN-MAITRE, S. [Pregnancy-associated hormones and fetal-maternal relations]. **Annales d'endocrinologie**, v. 76, n. 6 Suppl 1, p. S39-50, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26776288>>.

GELLERSEN, B.; BROSENS, I. A.; BROSENS, J. J. Decidualisation of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 6, p. 445–453, 2007. Disponível em:

<http://www.researchgate.net/profile/Ivo_Brosens/publication/5884408_Decidualization_of_the_human_endometrium_mechanisms_functions_and_clinical_perspectives/links/00b7d5215babbf18b1000000.pdf>.

GENDRON, R. L.; NESTEL, F. P.; LAPP, W. S.; BAINES, M. G. Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. **Reproduction**, v. 90, n. 2, p. 395–402, 1990.

GIBSON, D. A.; GREAVES, E.; CRITCHLEY, H. O. D.; SAUNDERS, P. T. K. Estrogen-dependent regulation of human uterine natural killer cells promotes vascular remodelling via secretion of CCL2. **Human Reproduction**, v. 30, n. 6, p. 1290–1301, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/dev067>>.

GOMEZ-LOPEZ, N.; ROMERO, R.; XU, Y.; MILLER, D.; LENG, Y.; PANAITESCU, B.; SILVA, P.; FARO, J.; ALHOUSSEINI, A.; GILL, N.; HASSAN, S. S.; HSU, C.-D. The

immunophenotype of amniotic fluid leukocytes in normal and complicated pregnancies.

American Journal of Reproductive Immunology, p. e12827, 3 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29500850>>.

GONG, H.; CHEN, Y.; XU, J.; XIE, X.; YU, D.; YANG, B.; KUANG, H. The regulation of ovary and conceptus on the uterine natural killer cells during early pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 73, 2017. Disponível em: <<http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-017-0290-1>>.

GRIFFITHS, G. M. Protein sorting and secretion during CTL killing. **Seminars in Immunology**, v. 9, n. 2, p. 109–115, abr. 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532397900592>>.

GRÖNBERG, A.; FERM, M. T.; NG, J.; REYNOLDS, C. W.; ORTALDO, J. R. IFN-gamma treatment of K562 cells inhibits natural killer cell triggering and decreases the susceptibility to lysis by cytoplasmic granules from large granular lymphocytes . • Rapid Reviews ! 30 days * from submission to initial decision Information about. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 12, p. 4397–4402., 1988.

GRUNDY, J. E.; TRAPMAN, J.; ALLAN, J. E.; MELIEF, C. J. Evidence for a protective role of cytomegalovirus and its control Evidence for a Protective Role of Interferon in Resistance to Murine Cytomegalovirus and Its Control by Non-H-2-Linked Genes. v. 37, n. 1, p. 143–150, 1982.

GUO, W.; LI, P.; ZHAO, G.; FAN, H.; HU, Y.; HOU, Y. Glucocorticoid receptor mediates the effect of progesterone on uterine natural killer cells. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 67, n. 6, p. 463–73, jun. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2012.01114.x>>.

HANNA, J.; MANDELBOIM, O. When killers become helpers. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 201–206, 2007.

HANNA, J.; WALD, O.; GOLDMAN-WOHL, D.; PRUS, D.; MARKEL, G.; GAZIT, R.; KATZ, G.; HAIMOV-KOCHMAN, R.; FUJII, N.; YAGEL, S.; PELED, A.; MANDELBOIM, O. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. **Blood**, v. 102, n. 5, p. 1569–77, 1 set. 2003. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-02-0517>>.

HANSEL, W.; BLAIR, R. M. Bovine corpus luteum: A historic overview and implications

for future research. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p. 1267–1294, maio 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0093691X96000982>>.

HEIJNEN, H. F.; DEBILI, N.; VAINCHENCKER, W.; BRETON-GORIUS, J.; GEUZE, H. J.; SIXMA, J. J. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. **Blood**, v. 91, n. 7, p. 2313–25, 1 abr. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516129>>.

HENDERSON, T. A.; SAUNDERS, P. T. K.; MOFFETT-KING, A.; GROOME, N. P.; CRITCHLEY, H. O. D. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 1, p. 440–9, jan. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2002-021174>>.

HERINGTON, J. L.; UNDERWOOD, T.; MCCONAHA, M.; BANY, B. M. Paracrine signals from the mouse conceptus are not required for the normal progression of decidualization. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4404–4413, 2009.

HIRSCH, E.; FILIPOVICH, Y.; MAHENDROO, M. Signaling via the type I IL-1 and TNF receptors is necessary for bacterially induced preterm labor in a murine model. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 5, p. 1334–1340, maio 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293780502449X>>.

HOOPEER, M.; HARDY, K.; HANDYSIDE, A.; HUNTER, S.; MONK, M. HPRT-deficient (Lesch–Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. **Nature**, v. 326, n. 6110, p. 292–295, 25 mar. 1987. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/326292a0>>.

HUANG, P.; WEI, L.; LI, X.; QIN, A. Effects of intrauterine perfusion of human chorionic gonadotropin in women with different implantation failure numbers. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 79, n. 2, p. e12809, fev. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/aji.12809>>.

HUBER, A. V.; SALEH, L.; BAUER, S.; HUSSLEIN, P.; KNÖFLER, M. TNFalpha-mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. **Placenta**, v. 27, n. 2–3, p. 127–36, fev. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400405000615>>.

HUNT, J. S.; ROBY, K. F. Implantation Factors. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 37,

n. 3, p. 635–645, set. 1994. Disponível em:

<<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003081-199409000-00017>>.

HUNTINGTON, N. D.; VOSSHENRICH, C. A. J.; DI SANTO, J. P. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 703–714, 2007.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 2, p. 95–109, abr. 2002. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610101000387>>.

ISHII, K. J.; KOYAMA, S.; NAKAGAWA, A.; COBAN, C.; AKIRA, S. Host Innate Immune Receptors and Beyond: Making Sense of Microbial Infections. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 6, p. 352–363, jun. 2008. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312808001510>>.

JANG, P. R.; BRACE, R. A. Amniotic fluid composition changes during urine drainage and tracheoesophageal occlusion in fetal sheep. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 167, n. 6, p. 1732–41, dez. 1992. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1471691>>.

JUELKE, K.; KILLIG, M.; LUETKE-EVERSLOH, M.; PARENTE, E.; GRUEN, J.; MORANDI, B.; FERLAZZO, G.; THIEL, A.; SCHMITT-KNOSALLA, I.; ROMAGNANI, C. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. **Blood**, v. 116, n. 8, p. 1299–1307, 26 ago. 2010. Disponível em:

<<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-11-253286>>.

KABLY AMBE, A.; LÓPEZ ORTIZ, C. S.; SERVIERE ZARAGOZA, C.; VELÁZQUEZ CORNEJO, G.; PÉREZ PEÑA, E.; SANTOS HALISCACK, R.; LUNA ROJAS, M.; VALERIO, E.; SANTANA, H.; GAVIÑO GAVIÑO, F. [Mexican National Consensus on Assisted Reproduction Treatment]. **Ginecologia y obstetricia de Mexico**, v. 80, n. 9, p. 581–624, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23243837>>.

KALKUNTE, S.; CHICHESTER, C. O.; GOTSCH, F.; SENTMAN, C. L.; ROMERO, R.; SHARMA, S. Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 59, n. 5, p. 425–32, maio 2008.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18405313>>.

KANEVSKIY, L. M.; TELFORD, W. G.; SAPOZHNIKOV, A. M.; KOVALENKO, E. I. Lipopolysaccharide induces IFN- γ production in human NK cells. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JAN, p. 1–10, 2013.

KING, a; LOKE, Y. W. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. **Immunology today**, v. 12, n. 12, p. 432–5, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1786078>>.

KING, A. Uterine leukocytes and decidualization. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 1, p. 28–36, 1 jan. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/6.1.28>>.

KING, A.; GARDNER, L.; LOKE, Y. W. W. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 11, n. 5, p. 1079–82, 1 maio 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019300>>.

KOCH, J.; STEINLE, A.; WATZL, C.; MANDELBOIM, O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 4, p. 182–191, abr. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490613000124>>.

KOO, H. S.; KWAK-KIM, J.; YI, H. J.; AHN, H. K.; PARK, C. W.; CHA, S. H.; KANG, I. S.; YANG, K. M. Resistance of uterine radial artery blood flow was correlated with peripheral blood NK cell fraction and improved with low molecular weight heparin therapy in women with unexplained recurrent pregnancy loss. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 73, n. 2, p. 175–84, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339113>>.

KOOPMAN, L. A.; KOPCOW, H. D.; RYBALOV, B.; BOYSON, J. E.; ORANGE, J. S.; SCHATZ, F.; MASCH, R.; LOCKWOOD, C. J.; SCHACHTER, A. D.; PARK, P. J.; STROMINGER, J. L. Human Decidual Natural Killer Cells Are a Unique NK Cell Subset with Immunomodulatory Potential. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 8, p. 1201–1212, 2003. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20030305>>.

KOPCOW, H. D.; ALLAN, D. S. J.; CHEN, X.; RYBALOV, B.; ANDZELM, M. M.; GE,

B.; STROMINGER, J. L. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15563–15568, 2005. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507835102>>.

KRASTIŃA, Z.; ŠAVLOVSKIS, J.; LANGRATE, A.; ZNOTIŃŠ, T. Rupture of uterine muscle hematoma following diagnostic amniocentesis at 18 weeks and uterine dehiscence at term. **International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology**, v. 6, n. 10, p. 4677, 23 set. 2017. Disponível em:

<<http://www.ijrcog.org/index.php/ijrcog/article/view/3543>>.

LADEMANN, U.; KALLUNKI, T.; JÄÄTTELÄ, M. A20 zinc finger protein inhibits TNF-induced apoptosis and stress response early in the signaling cascades and independently of binding to TRAF2 or 14-3-3 proteins. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, n. 3, p. 265–272, 2001.

LAIRD, S. M.; TUCKERMAN, E. M.; CORK, B. A.; LINJAWI, S.; BLAKEMORE, A. I. F.; LI, T. C. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 2, p. 163–174, 2003.

LANIER, L. L. NK CELL RECOGNITION. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 225–274, abr. 2005. Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526>>.

LASH, G. E.; OTUN, H. A.; INNES, B. A.; BULMER, J. N.; SEARLE, R. F.; ROBSON, S. C. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 2, p. 374–81, 1 ago. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.105.040337>>.

LASH, G. E.; OTUN, H. A.; INNES, B. A.; KIRKLEY, M.; DE OLIVEIRA, L.; SEARLE, R. F.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 14, p. 2512–8, dez. 2006a. Disponível em:

<<http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.06-6616com>>.

LASH, G. E.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Review: Functional role of uterine natural

killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. **Placenta**, v. 31 Suppl, p. S87-92, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20061017>>.

LASH, G. E.; SCHIESSL, B.; KIRKLEY, M.; INNES, B. A.; COOPER, A.; SEARLE, R. F.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, n. 3, p. 572–80, set. 2006b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816146>>.

LEI, Z. M.; RAO, C. V. Gonadotropin receptors in human fetoplacental unit: Implications for hCG as an intracrine, paracrine and endocrine regulator of human fetoplacental function. **Placenta**, v. 13, p. 213–224, jan. 1992. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400405803170>>.

LEONARD, S.; MURRANT, C.; TAYADE, C.; VAN DEN HEUVEL, M.; WATERING, R.; CROY, B. A. Mechanisms Regulating Immune Cell Contributions to Spiral Artery Modification - Facts and Hypotheses - A Review. **Placenta**, v. 27, n. SUPPL., p. 40–46, 2006.

LIMA, P. D. a.; CROY, B. a.; DEGAKI, K. Y.; TAYADE, C.; YAMADA, a. T. Heterogeneity in composition of mouse uterine natural killer cell granules. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 1, p. 195–204, 2012.

LIMA, P. D. A.; PAFFARO, V. A.; YAMADA, A. T. Functional Duality of Mouse Uterine Natural Killer Cell in Pregnancy. In: CHAOUAT, G.; SANDRA, O.; LÉDÉE, N. (Ed.). **Immunology of Pregnancy 2013**. Bentham Sc ed. [s.l: s.n.]p. 335–359.

LIN, J.; LOJUN, S.; LEI, Z. M.; WU, W. X.; PEINER, S. C.; RAO, C. V. Lymphocytes from pregnant women express human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 111, n. 1, p. R13-7, 28 abr. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544304>>.

LIPPE, E. M. O.; YAMADA, A. T.; SHARMA, S. Human Uterine Natural Killer Cells. Friend or Foes of Pregnancy Outcomes. In: CHAOUAT, G.; SANDRA, O.; LÉDÉE, N. (Ed.). **Immunology of Pregnancy 2013**. Bentham Sc ed. [s.l: s.n.]p. 370–376.

LISSANDRELLO, C.; DUBAY, R.; KOTZ, K. T.; FIERING, J. Purification of Lymphocytes by Acoustic Separation in Plastic Microchannels. **SLAS technology**, p. 2472630317749944, 1 jan. 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2472630317749944>>.

LIU, C.-C.; WALSH, C. M.; YOUNG, J. D.-E. Perforin: structure and function. **Immunology Today**, v. 16, n. 4, p. 194–201, abr. 1995. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167569995801219>>.

LONG, E. O. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm.

Immunological Reviews, v. 224, n. 1, p. 70–84, ago. 2008. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00660.x>>.

LOPEZ, J. A.; JENKINS, M. R.; RUDD-SCHMIDT, J. A.; BRENNAN, A. J.; DANNE, J. C.; MANNERING, S. I.; TRAPANI, J. A.; VOSKOBOINIK, I. Rapid and unidirectional perforin pore delivery at the cytotoxic immune synapse. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 5, p. 2328–34, 1 set. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885110>>.

MACE, E. M.; DONGRE, P.; HSU, H.-T.; SINHA, P.; JAMES, A. M.; MANN, S. S.; FORBES, L. R.; WATKIN, L. B.; ORANGE, J. S. Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. **Immunology and cell biology**, v. 92, n. 3, p. 245–55, mar. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24445602>>.

MAIO, M.; ALTOMONTE, M.; TATAKE, R.; ZEFF, R. A.; FERRONE, S. Reduction in susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of human FO-1 melanoma cells after induction of HLA class I antigen expression by transfection with B2m gene. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 1, p. 282–289, 1 jul. 1991. Disponível em:

<<http://www.jci.org/articles/view/115289>>.

MALLIDI, T. V.; CRAIG, L. E.; SCHLOEMANN, S. R.; RILEY, J. K. Murine Endometrial and Decidual NK1.1+ Natural Killer Cells Display a B220+CD11c+ Cell Surface

Phenotype1. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 2, p. 310–318, 1 ago. 2009. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2006.163>>.

MANSOUR, R.; TAWAB, N.; KAMAL, O.; EL-FAISSAL, Y.; SEROUR, A.;

ABOULGHAR, M.; SEROUR, G. Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer significantly improves the implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. **Fertility and sterility**, v. 96, n. 6, p. 1370–1374.e1, dez. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047664>>.

MAZIARZ, R. T.; MENTZER, S. J.; BURAKOFF, S. J.; FALLER, D. V. Distinct effects of

interferon- γ and MHC class I surface antigen levels on resistance of the K562 tumor cell line to natural killer-mediated lysis. **Cellular Immunology**, v. 130, n. 2, p. 329–338, out. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000887499090276W>>.

MCFARLANE, S. M.; PASHMI, G.; CONNELL, M. C.; LITTLEJOHN, A. F.; TUCKER, S. J.; VANDENABEELE, P.; MACEWAN, D. J. Differential activation of nuclear factor- κ B by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. **FEBS Letters**, v. 515, n. 1–3, p. 119–126, 27 mar. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2802%2902450-X>>.

MCMANAMAN, J. L.; NEVILLE, M. C. Mammary physiology and milk secretion. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 5, p. 629–41, 29 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706546>>.

METKAR, S. S.; WANG, B.; AGUILAR-SANTELISES, M.; RAJA, S. M.; UHLIN-HANSEN, L.; PODACK, E.; TRAPANI, J. A.; FROELICH, C. J. Cytotoxic Cell Granule-Mediated Apoptosis. **Immunity**, v. 16, n. 3, p. 417–428, mar. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761302002868>>.

MINCHENKO, A.; BAUER, T.; SALCEDA, S.; CARO, J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 71, n. 3, p. 374–9, set. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7933988>>.

MIYAGI, T.; GIL, M. P.; WANG, X.; LOUTEN, J.; CHU, W.-M.; BIRON, C. A. High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 10, p. 2383–2396, 1 out. 2007. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20070401>>.

MIYAURA, H.; IWATA, M. Direct and Indirect Inhibition of Th1 Development by Progesterone and Glucocorticoids. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 3, p. 1087–1094, 2002. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.168.3.1087>>.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 9, p. 656–663, 2002.

MOFFETT, A.; COLUCCI, F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, p. 1872–1879, 1 maio 2014. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/68107>>.

MORETTA, L.; BIASSONI, R.; BOTTINO, C.; CANTONI, C.; PENDE, D.; MINGARI, M. C.; MORETTA, A. Human NK cells and their receptors. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 15, p. 1539–1544, dez. 2002. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457902000370>>.

MOSTAJERAN, F.; GODAZANDEH, F.; AHMADI, S. M.; MOVAHEDI, M.; JABALAMELIAN, S. A. Effect of intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer on pregnancy rate: A prospective randomized study. **Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 22, p. 6, 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28400828>>.

MURAYAMA, C.; MIYAZAKI, H.; MIYAMOTO, A.; SHIMIZU, T. Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 350, n. 1, p. 1–9, 5 mar. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155568>>.

MURPHY, S. P.; FAST, L. D.; HANNA, N. N.; SHARMA, S. Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 6, p. 4084–90, 15 set. 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148158>>.

MURPHY, S. P.; HANNA, N. N.; FAST, L. D.; SHAW, S. K.; BERG, G.; PADBURY, J. F.; ROMERO, R.; SHARMA, S. Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 200, n. 3, p. 308.e1-308.e9, mar. 2009. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937808020553>>.

NIEDBALA, W.; WEI, X.; LIEW, F. Y. IL-15 induces type 1 and type 2 CD4+ and CD8+ T cells proliferation but is unable to drive cytokine production in the absence of TCR activation or IL-12 / IL-4 stimulation in vitro. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 2, p. 341–347, fev. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/1521-4141%28200202%2932%3A2%3C341%3A%3AAID-IMMU341%3E3.0.CO%3B2-X>>.

NISHIMURA, M.; MITSUNAGA, S.; AKAZA, T.; MITOMI, Y.; TADOKORO, K.; JUJI, T. Protection against natural killer cells by interferon-gamma treatment of K562 cells cannot be

explained by augmented major histocompatibility complex class I expression. **Immunology**, v. 83, n. 1, p. 75–80, 1994.

OGANDO, D.; PAZ, D.; CELLA, M.; FRANCHI, A. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice.

Reproduction, v. 125, n. 1, p. 95–110, 1 jan. 2003. Disponível em:

<<http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/rep.0.1250095>>.

OH, M.-J.; CROY, B. A. A map of relationships between uterine natural killer cells and

progesterone receptor expressing cells during mouse pregnancy. **Placenta**, v. 29, n. 4, p. 317–23, abr. 2008. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400408000179>>.

OKADA, H.; NAKAJIMA, T.; SANEZUMI, M.; IKUTA, A.; YASUDA, K.; KANZAKI, H.

Progesterone Enhances Interleukin-15 Production in Human Endometrial Stromal Cells in

Vitro 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 12, p. 4765–4770,

dez. 2000. Disponível em: <[https://academic.oup.com/jcem/article-](https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.85.12.7023)

[lookup/doi/10.1210/jcem.85.12.7023](https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.85.12.7023)>.

ORANGE, J. S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. **Nature**

reviews. Immunology, v. 8, n. 9, p. 713–25, set. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19172692>>.

OTA, K.; DAMBAEVA, S.; KIM, M. W.-I.; HAN, A.-R.; FUKUI, A.; GILMAN-SACHS,

A.; BEAMAN, K.; KWAK-KIM, J. 1,25-Dihydroxy-vitamin D3 regulates NK-cell

cytotoxicity, cytokine secretion, and degranulation in women with recurrent pregnancy losses.

European journal of immunology, v. 45, n. 11, p. 3188–99, nov. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26257123>>.

OTUN, H. A.; LASH, G. E.; INNES, B. A.; BULMER, J. N.; NARUSE, K.; HANNON, T.;

SEARLE, R. F.; ROBSON, S. C. Effect of tumour necrosis factor- α in combination with

interferon- γ on first trimester extravillous trophoblast invasion. **Journal of reproductive**

immunology, v. 88, n. 1, p. 1–11, jan. 2011. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016503781000389X>>.

PAFFARO, V. A.; BIZINOTTO, M. C.; JOAZEIRO, P. P.; YAMADA, A. T. Subset

classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**, v. 24, n.

5, p. 479–488, 2003.

PARDO, J.; BALKOW, S.; ANEL, A.; SIMON, M. M. The differential contribution of granzyme A and granzyme B in cytotoxic T lymphocyte-mediated apoptosis is determined by the quality of target cells. **European journal of immunology**, v. 32, n. 7, p. 1980–5, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115618>>.

PARR, E. L.; PARR, M. B.; ZHENG, L. M.; YOUNG, J. D. Mouse Granulated Metrial Gland Cells Originate Killer by Local Activation of Uterine Natural. **Biology of Reproduction**, v. 841, n. December, p. 834–841, 1991.

PARR, E. L.; YOUNG, L. H.; PARR, M. B.; YOUNG, J. D. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 145, n. 7, p. 2365–72, 1 out. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1975830>>.

PETRAGLIA, F.; FLORIO, P.; NAPPI, C.; GENAZZANI, A. R. Peptide Signaling in Human Placenta and Membranes: Autocrine, Paracrine, and Endocrine Mechanisms*. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 2, p. 156–186, abr. 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-17-2-156>>.

RAMATHAL, C. Y.; BAGCHI, I. C.; TAYLOR, R. N.; BAGCHI, M. K. Endometrial decidualization: Of mice and men. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 28, n. 1, p. 17–26, 2010.

RAMIREZ, R.; SOLANA, R.; CARRACEDO, J.; ALONSO, M. C.; PEÑA, J. Mechanisms involved in NK resistance induced by interferon- γ . **Cellular Immunology**, v. 140, n. 1, p. 248–256, mar. 1992. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000887499290191Q>>.

RAO, C. V. An overview of the past, present, and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. **Seminars in reproductive medicine**, v. 19, n. 1, p. 7–17, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11394207>>.

RENAUD, S. J.; POSTOVIT, L.-M.; MACDONALD-GOODFELLOW, S. K.; MCDONALD, G. T.; CALDWELL, J. D.; GRAHAM, C. H. Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness in vitro. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 2, p. 237–43, 1 ago. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.104.038000>>.

RENFREE, M. B.; HENSLEIGH, H. C.; MCLAREN, A. Developmental changes in the

composition and amount of mouse fetal fluids. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 33, n. 2, p. 435–46, abr. 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/51898>>.

ROBSON, A.; HARRIS, L. K.; INNES, B. A.; LASH, G. E.; ALJUNAIDY, M. M.; APLIN, J. D.; BAKER, P. N.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 26, n. 12, p. 4876–85, dez. 2012a. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.12-210310>>.

ROBSON, A.; HARRIS, L. K.; INNES, B. A.; LASH, G. E.; ALJUNAIDY, M. M.; APLIN, J. D.; BAKER, P. N.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 26, n. 12, p. 4876–85, dez. 2012b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919072>>.

ROSMARAKI, E. E.; DOUAGI, I.; ROTH, C.; COLUCCI, F.; CUMANO, A.; DI SANTO, J. P. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 6, p. 1900–1909, 2001.

SAITO, S.; NISHIKAWA, K.; MORII, T.; ENOMOTO, M.; NARITA, N.; MOTOYOSHI, K.; ICHIO, M. Cytokine production by CD16-CD56 bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. **International Immunology**, v. 5, n. 5, p. 559–563, 1993.

SANCHEZ-MAZAS, A.; DJOULAH, S.; BUSSON, M.; LE MONNIER DE GOUVILLE, I.; POIRIER, J.-C.; DEHAY, C.; CHARRON, D.; EXCOFFIER, L.; SCHNEIDER, S.; LANGANEY, A.; DAUSSET, J.; HORS, J. A linkage disequilibrium map of the MHC region based on the analysis of 14 loci haplotypes in 50 French families. **European Journal of Human Genetics**, v. 8, n. 1, p. 33–41, 22 jan. 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/5200391>>.

SANTIBAÑEZ, A.; GARCÍA, J.; PASHKOVA, O.; COLÍN, O.; CASTELLANOS, G.; SÁNCHEZ, A. P.; DE LA JARA, J. F. Effect of intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer on clinical pregnancy rates from in vitro fertilisation cycles: a prospective study. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 9, 29 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24476536>>.

SANTOLI, D.; TRINCHIERI, G.; KOPROWSKI, H.; SANTOLI, D.; TRINCHIERI, G.;

KOPROWSKI, H. Cell-Mediated Cytotoxicity Against Virus-Infected Target Cells in Humans : II . Interferon Induction and Activation of Natural Killer Cells • Rapid Reviews ! 30 days * from submission to initial decision Information about subscribing to The Journal of Imm. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 2, p. 532–538, 1978.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Immune-neuroendocrine interactions. **Immunology Today**, v. 16, n. 7, p. 318–322, jul. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167569995801448>>.

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 75, n. 1–2, p. 73–94, jan. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432002002221>>.

SCHUMACHER, A.; COSTA, S.-D.; ZENCLUSSEN, A. C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 196, 8 maio 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00196/abstract>>.

SCHUMACHER, A.; HEINZE, K.; WITTE, J.; POLOSKI, E.; LINZKE, N.; WOIDACKI, K.; ZENCLUSSEN, A. C. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 6, p. 2650–8, 15 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1202698>>.

SERIN, S.; ARIKAN, D. C. Retrospective analysis of the results of amniocentesis procedure at an university clinic. **Perinatal Journal**, v. 21, n. 2, p. 47–52, 2013. Disponível em: <<http://www.perinataljournal.com/Archive/Article/20130212001>>.

SERIN, S.; ÖZÇELİK, B.; BAPBUOĞ, M.; KÝLYÇ, H.; OKUR, D.; EREZ, R. Predictive value of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in preeclampsia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 100, n. 2, p. 143–145, jan. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211501004845>>.

SIMON, C.; PELLICER, A.; POLAN, M. L. Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. **Human Reproduction**, v. 10, n. suppl 2, p. 43–54, 1 dez. 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/10.suppl_2.43>.

SONG, X. Y.; ZENG, L.; JIN, W.; PILO, C. M.; FRANK, M. E.; WAHL, S. M. Suppression of streptococcal cell wall-induced arthritis by human chorionic gonadotropin. **Arthritis and**

rheumatism, v. 43, n. 9, p. 2064–72, set. 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014358>>.

STEPP, S. E.; MATHEW, P. A.; BENNETT, M.; DE SAINT BASILE, G.; KUMAR, V.

Perforin: more than just an effector molecule. **Immunology Today**, v. 21, n. 6, p. 254–256, jun. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167569900016224>>.

STEWART, I.; PEEL, S. Cell and Tissue The Structure and Differentiation of Granulated Metrial Gland Cells of the Pregnant Mouse Uterus. v. 527, p. 517–527, 1977.

STINCHCOMBE, J. C.; GRIFFITHS, G. M. Regulated Secretion from Hemopoietic Cells.

The Journal of Cell Biology, v. 147, n. 1, p. 1–5, 4 out. 1999. Disponível em:

<<http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.147.1.1>>.

SUSANTO, O.; STEWART, S. E.; VOSKOBOINIK, I.; BRASACCHIO, D.; HAGN, M.;

ELLIS, S.; ASQUITH, S.; SEDELIES, K. A.; BIRD, P. I.; WATERHOUSE, N. J.;

TRAPANI, J. A. Mouse granzyme A induces a novel death with writhing morphology that is mechanistically distinct from granzyme B-induced apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 20, n. 9, p. 1183–93, set. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744295>>.

TANG, A. W.; ALFIREVIC, Z.; QUENBY, S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: A systematic review. **Human**

Reproduction, v. 26, n. 8, p. 1971–1980, 2011.

THAXTON, J. E.; NEVERS, T.; LIPPE, E. O.; BLOIS, S. M.; SAITO, S.; SHARMA, S.

NKG2D Blockade Inhibits Poly(I:C)-Triggered Fetal Loss in Wild Type but Not in IL-10-/- Mice. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3639–3647, 1 abr. 2013. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1203488>>.

TIMONEN, T.; REYNOLDS, C. W.; ORTALDO, J. R.; HERBERMAN, R. B. Isolation of human and rat natural killer cells. **Journal of immunological methods**, v. 51, n. 3, p. 269–

77, jan. 1982. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175982903933>>.

TSAMPALAS, M.; GRIDELET, V.; BERNDT, S.; FOIDART, J.-M.; GEENEN, V.;

PERRIER D'HAUTERIVE, S. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. **Journal of reproductive immunology**, v. 85, n. 1, p. 93–8, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227765>>.

TUCKERMAN, E.; MARIEE, N.; PRAKASH, A.; LI, T. C.; LAIRD, S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 87, n. 1–2, p. 60–66, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2010.07.001>>.

VAN DER MEER, A.; LUKASSEN, H. G. M.; VAN LIEROP, M. J. C.; WIJNANDS, F.; MOSSELMAN, S.; BRAAT, D. D. M.; JOOSTEN, I. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon- γ production by uterine natural killer cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 189–195, 2004.

VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W.; BEYAERT, R.; FIERIS, W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 10, p. 392–399, out. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892400890881>>.

VERMA, S.; HIBY, S. E.; LOKE, Y. W.; KING, A. Human Decidual Natural Killer Cells Express the Receptor for and Respond to the Cytokine Interleukin 151. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 959–968, 1 abr. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod62.4.959>>.

VEUGELERS, K.; MOTYKA, B.; FRANTZ, C.; SHOSTAK, I.; SAWCHUK, T.; BLEACKLEY, R. C. The granzyme B-serglycin complex from cytotoxic granules requires dynamin for endocytosis. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3845–3853, 2004.

VISSER, W.; BECKMANN, I.; KNOOK, M. A. H.; WALLENBURG, H. C. S. Soluble tumor necrosis factor receptor II and soluble cell adhesion molecule 1 as markers of tumor necrosis factor- α release in preeclampsia. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 81, n. 8, p. 713–719, ago. 2002. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034%2Fj.1600-0412.2002.810805.x>>.

WALLACE, A. E.; FRASER, R.; CARTWRIGHT, J. E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: A remodelling partnership. **Human Reproduction Update**, v. 18, n. 4, p. 458–471, 2012.

WANG, R.; JAW, J. J.; STUTZMAN, N. C.; ZOU, Z.; SUN, P. D. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 2, p. 299–309, fev. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0611308>>.

WELSH, J. R. Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of

mice. I. Characterization of natural killer cell induction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 148, n. 1, p. 163–181, 1 jul. 1978. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.148.1.163>>.

WIDE, L.; WIDE, M. Chorionic gonadotrophin in the mouse from implantation to term. **Reproduction**, v. 57, n. 1, p. 5–9, 1 set. 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/513006>>.

WIEDE, F.; TIGANIS, T. Isolation and Characterization of Mouse Intrahepatic Lymphocytes by Flow Cytometry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1725, p. 301–311, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29322426>>.

WU, X.; WEI, H.; ZHANG, J.; TIAN, Z. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. **Cellular & molecular immunology**, v. 3, n. 2, p. 131–7, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696900>>.

XIAO-YAN, C.; JIE, L.; DANG, J.; TAO, L.; XIN-RU, L.; GUANG-LUN, Z. A highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay for detecting human embryonic human chorionic gonadotropin in spent embryo culture media during IVF-ET cycle. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 3, p. 377–82, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274513>>.

YADI, H.; BURKE, S.; MADEJA, Z.; HEMBERGER, M.; MOFFETT, A.; COLUCCI, F. Unique Receptor Repertoire in Mouse Uterine NK cells. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6140–6147, 1 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.181.9.6140>>.

YAO, M. W. M.; LIM, H.; SCHUST, D. J.; CHOE, S. E.; FARAGO, A.; DING, Y.; MICHAUD, S.; CHURCH, G. M.; MAAS, R. L. Gene expression profiling reveals progesterone-mediated cell cycle and immunoregulatory roles of Hoxa-10 in the preimplantation uterus. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 17, n. 4, p. 610–27, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12554760>>.

YE, W.; ZHENG, L.-M.; YOUNG, J. D.-E.; LIU, C.-C. The Involvement of Interleukin (IL)-15 in Regulating the Differentiation of Granulated Metrial Gland Cells in Mouse Pregnant Uterus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 6, p. 2405–2410, 15 dez. 1996. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.184.6.2405>>.

ZAVAN, B.; DO AMARANTE-PAFFARO, A. M.; PAFFARO, V. A. ???-Actin down

regulation and perforin loss in uterine natural killer cells from LPS-treated pregnant mice.

Physiological Research, v. 64, n. 3, p. 427–432, 2015.

ZAVAN, B.; DO AMARANTE PAFFARO, A. M.; JOAZEIRO, P. P.; YAMADA, A. T.; PAFFARO JR., V. A. Evidence for fibronectin role on uterine natural killer cells migration, proliferation, differentiation and survival during pregnancy. In: **Fibronectin: Current Concepts in Structure, Function and Pathology**. [s.l.: s.n.]

ZAVAN, B.; PAFFARO, A. M. A.; JOAZEIRO, P. P.; YAMADA, A. T.; PAFFARO, V. A. Immunocytochemical studies of adhesion molecules on mouse UNK cells and their extracellular matrix ligands during mouse pregnancy. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, v. 293, n. 6, p. 1081–8, jun. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.21117>>.

ZHANG, J.; CHEN, Z.; SMITH, G. N.; CROY, B. A. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cellular & molecular immunology**, v. 8, n. 1, p. 1–11, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711229>>.

ZHANG, J.; DONG, H.; WANG, B.; ZHU, S.; CROY, B. Dynamic changes occur in patterns of endometrial EFNB2/EPHB4 expression during the period of spiral arterial modification in mice. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 3, p. 450–8, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18463357>>.

ZHANG, Y. M.; RAO, C. V.; LEI, Z. M. Macrophages in human reproductive tissues contain luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 49, n. 2, p. 93–100, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765348>>.

ZHENG, L. M.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D. Perforin-expressing cells during spontaneous abortion. **Biology of reproduction**, v. 48, n. 5, p. 1014–9, maio 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8481464>>.

ZHENG, M.; SHI, H.; SEGALOFF, D. L.; VAN VOORHIS, B. J.; ZHENG, M. Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 1, p. 179–87, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133673>>.

ZIECIK, A. J.; KACZMAREK, M. M.; BLITEK, A.; KOWALCZYK, A. E.; LI, X.; RAHMAN, N. A. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor.

Molecular and cellular endocrinology, v. 269, n. 1–2, p. 51–60, 15 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367919>>.

9. ANEXOS



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Células uNK de camundongos desafiadas em cultivo primário condicionado para decifrar a sua competência funcional na atividade citotóxica/citolítica no útero gestante", protocolo nº 4054-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Aureo T. Yamada / Aline Freitas de Paula Melo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 26 de outubro de 2015.

Vigência do projeto: 11/2015-01/2017

Espécie/Linhagem: Camundongo isogênico / C57BL/6J

No. de animais: 15

Idade/Peso: 10 semanas / 25g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

Espécie/Linhagem: Camundongo isogênico / C57BL/6J

No. de animais: 60

Peso/Idade: 10 semanas / 25g

Sexo: fêmeas

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 26 de outubro de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

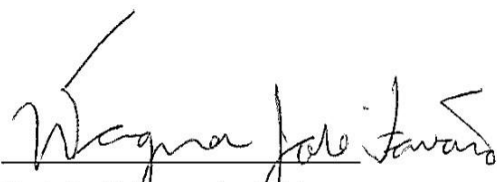
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Células uNK de camundongos desafiadas em cultivo primário condicionado para decifrar a sua competência funcional na atividade citotóxica/citolítica no útero gestante** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **4054-1**), de responsabilidade da **Prof. Dr. Aureo T. Yamada e Aline Freitas de Paula Melo**, teve o título alterado para **Ensaio in vitro de células uNK de camundongo em meio suplementado com hormônios gonadotrófico coriônico e estrogênio.**

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 26/10/2015.

Campinas, 11 de maio de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

Declaração: dissertação não infringe dispositivos da lei n°9610/98

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha coautoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado intitulada “ Ensaaios *in vitro* de células uNK de camundongos em meio suplementado com hormônios gonadotrófico coriônico e estrogênico”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 01 de agosto de 2018.



Aline Freitas de Paula Melo (Autor)

RG n.º 46.958.933-4



Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)

RG n.º 16567907-4